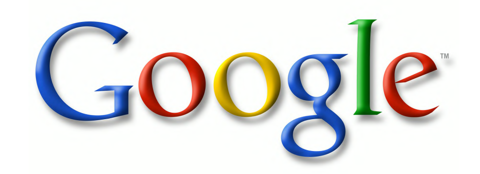






ARCHIV FÜR HYGIENE.

(BEGRÜNDET VON MAX v. PETTENKOFER.)

UNTER MITWIRKUNG

VON

Prof. Dr. O. BOLLINGER, München; Prof. Dr. BONHOFF, Marburg a. L.; Prof. Dr. R. EMMERICH, München; Prof. Dr. F. ERISMANN, Zürich; Prof. Dr. HEIM, Erlangen; Prof. Dr. F. HUEPPE, Prag; Prof. Dr. KABRHEL, Prag; Prof. Dr. F. KRATSCHMER, Wien; Prof. Dr. K. LEHMANN, Würzburg; Prof. Dr. A. LODE, Innsbruck; Prof. Dr. L. PFEIFFER, Rostock; Prof. Dr. W. PRAUSNITZ, Graz; Prof. Dr. F. RENK, Dresden; Prof. Dr. SCHOTTELIUS, Freiburg i. B.; Generaloberarzt Dr. A. SCHUSTER, München; Prof. Dr. WERNICKE, Posen.

HERAUSGEGEBEN

VON

J. FORSTER, M. GRUBER, FR. HOFMANN, M. RUBNER, W. SILBERSCHMIDT,

o. ö. PROFESSOREN DER HYGIENE UND DIREKTOREN DER HYGIENISCHEN INSTITUTE AN DEN UNIVERSITÄTEN ZU

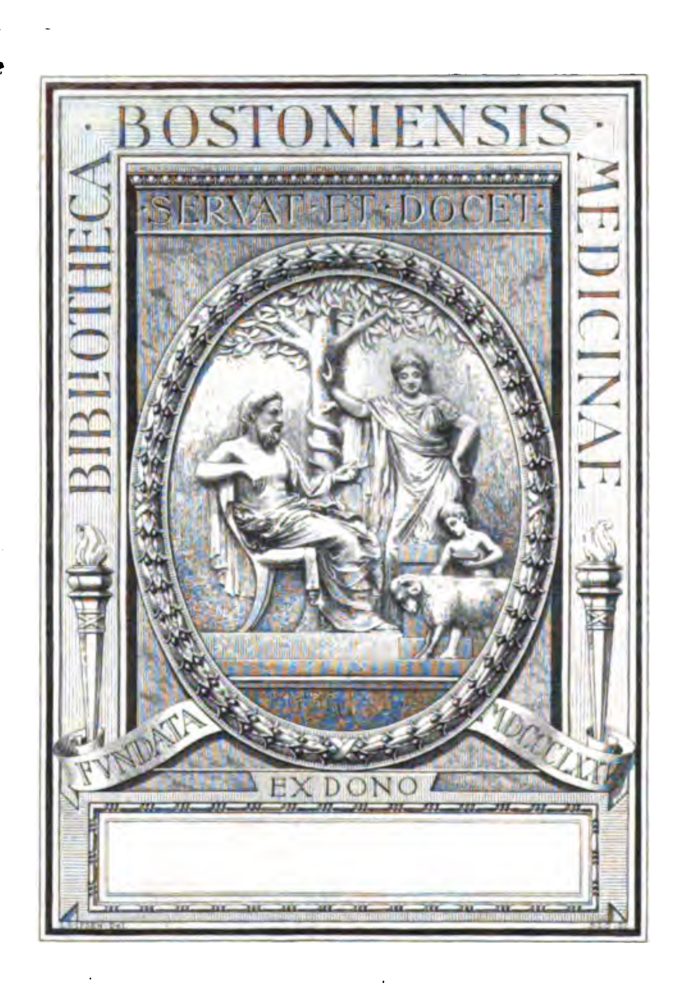
STRASSBURG MÜNCHEN LEIPZIG BERLIN ZÜRICH.

ZWEIUNDSECHZIGSTER BAND.

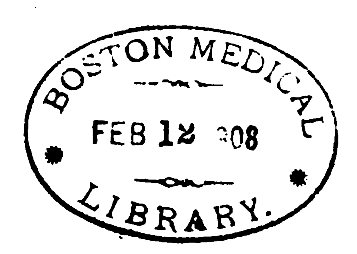
Mit 6 Abbildungen und 4 Tafeln.



MÜNCHEN UND BERLIN.
DRUCK UND VERLAG VON R. OLDENBOURG.
1907.


BIBLIOTHECA · BOSTONIENSIS · MEDICINAE
SERVAT · ET · DOCET
FVNDATA
MDCCCLXXV
EX DONO





Bedeutung und Nachweis des Bacterium coli im Wasser und eine neue Modifikation der Eijkmanschen Methode.[1])

Von

Dr. Jaromír Bulíř,
Assistent am Institute.

(Aus dem k. k. hygienischen Institut des Prof. Dr. Gustav Kabrhel in Prag.)

Das Eindringen von Bestandteilen der Fäkalien, insbesondere von in denselben enthaltenen Mikroben in das Grundwasser, kann durch verschiedenartige Umstände verursacht werden; es geschieht insbesondere an solchen Stellen, wo sich in den Bodenschichten Risse vorfinden, mittels welcher dann die Sammelorte der Fäkalien mit dem Grundwasser in direkter Verbindung stehen, oder bei gleichmäfsigen, kompakten Bodenschichten (Anschwemmungen), wo der Filtrationseffekt der Schichten, die sich zwischen den verunreinigten Stellen (Senkgruben, Kanälen usw.) und dem Grundwasser befinden, ungenügend ist.

Endlich ist es bei mangelhafter Beschaffenheit eines Brunnens (Ausmauerung, Herstellung der Terrainoberfläche in der Umgebung desselben) oder bei fehlerhafter Fassung einer Quelle, die Verunreinigung des Wassers direkt von der Oberfläche möglich.

Bei Erwägung des Umstandes, dafs Fäkalien pathogene Mikroben enthalten können, die dann auch in das Wasser übergehen und bei Gebrauch desselben nicht nur einzelne Erkrankungen sondern auch Epidemien verursachen können, wie dies bei Typhus,

1) Der böhm. Kaiser-Franz-Josephsakademie vorgelegt am 19. I. 1907.

Cholera, Dysenterie usw. der Fall ist, wird die, bei Gebrauch eines durch Fäkalien verunreinigten Wassers entstehende Gefahr begreiflich. Es ist daher klar, warum eine Methode zur Feststellung einer derartigen Verunreinigung des Wassers intensiv gesucht wurde.

Seinerzeit glaubte man mit chemischen Methoden zur Feststellung einer fäkalen Verunreinigung des Wassers ausreichen und auf Grund der Bestimmungen von Ammoniak, salpetriger Säure und der organischen Stoffe, eventuell von Chlor und Salpetersäure, entscheiden zu können, ob das geprüfte Wasser einwandfrei oder schädlich ist. Mit der Zeit stellte sich jedoch heraus, dafs diese Bestimmungen für sich allein nicht genügen, ja dafs sie sogar in manchen Fällen zu Irrtümern führen. Obwohl ein gröfserer Gehalt an Ammoniak, salpetriger Säure und organischen Stoffen im Grundwasser den Verdacht auf fäkale Verunreinigung erweckt, ist eine solche durch denselben noch absolut nicht nachgewiesen, denn es sind Fälle vorgekommen, wo diese Bestandteile des Wassers als Stoffe vegetabilisch-organischen Ursprungs erkannt wurden. Werden anderseits die erwähnten verdächtigen Bestandteile im Wasser nicht vorgefunden, so ist dadurch noch nicht nachgewiesen, dafs eine fäkale Verunreinigung des geprüften Wassers nicht vorliege; so zeigte z. B. Kabrhel(1) einen Fall, in welchem die bakteriologische Analyse und der lokale Augenschein die fäkale Verunreinigung zweifellos bewies, wogegen die chemischen Methoden auf diesen Umstand nicht aufmerksam gemacht haben.

Es wurde also das Augenmerk den bakteriologischen Methoden zugewandt und das Bacterium coli commune, Escherich, dieser regelmäfsige Bewohner des Darminhaltes bei Mensch und Tier, als Indikator der fäkalen Verunreinigung des Wassers vorgeschlagen; dies fand viele Anhänger aber auch zahlreiche Gegner, die das Bacterium coli für einen ubiquiten (überall anwesenden) Mikroorganismus erklärten, der überall in der Luft, im Boden, im Wasser vorgefunden wird, gleich ob diese fäkal verunreinigt sind oder nicht. Die Ansichten der Anhänger und Gegner der Ubiquitätslehre wurden bereits vielfach besprochen und ich

glaube daher berechtigt zu sein, dieselben nicht zu wiederholen und nur auf die Arbeiten von Kaiser(2), Christian(3), Eijkman(4) und Neumann(5) hinweisen zu können.

Durch den Vergleich aller in den genannten Arbeiten zitierten Ansichten kommen wir jedoch zu dem Schlufs, dafs dem typischen Bacterium coli, das wahrscheinlich aus dem Darminhalt stammt, eine gewisse Bedeutung als Indikator der fäkalen Verunreinigung nicht abgesprochen werden darf. Um zu bestimmen, ob der gefundene Kolibazillus aus einem menschlichen Darm stammt, fehlt uns allerdings bisher noch jede Methode, doch kann durch diesen Mangel die Bedeutung des Bacterium coli als Indikator nur wenig abgeschwächt werden, denn es ist unbestreitbar, dafs da, wo die örtlichen Verhältnisse eine Verunreinigung des Wassers mit Tierfäkalien zulassen, auch das Eindringen der menschlichen Exkremente nicht ausgeschlossen ist.

Es ist selbstverständlich, dafs der Fachmann, dem die Begutachtung des Wassers anvertraut ist, bei der örtlichen Inaugenscheinnahme und Entnahme der Proben derart vorgehen mufs, dafs eine eventuelle zufällige Verunreinigung ausgeschlossen wird, wozu allerdings keine Regeln oder Vorschriften angegeben werden können, da die Umstände und Verhältnisse in verschiedenen Fällen verschieden sind, und der Prüfende sich von Fall zu Fall den bei der Arbeit einzuschlagenden Weg selbst bestimmen mufs. In den Ergebnissen einer derart richtig durchgeführten Analyse (allerdings in Verbindung mit der bakteriologischen und chemischen Analyse) findet dann der Prüfende die Bestätigung der Ansicht, die er sich bei der örtlichen Inaugenscheinnahme über das betreffende Wasser gemacht hat.

Es frägt sich nun, warum die Ergebnisse und Ansichten, welche die Bedeutung des Bacterium coli im Wasser betreffen, bei verschiedenen Autoren so verschieden sind?

Es scheint, dafs die Ursache in dem Umstand zu suchen wäre, dafs

1. nicht immer mit allen diagnostischen Behelfen gesucht wurde, ob der gefundene als Bacterium coli bezeichnete

Mikroorganismus sämtliche morphologische und biologische Eigenschaften des typischen Bacterium coli aufweise und

2. dafs zur Isolation verschiedene Methoden benutzt werden, deren Empfindlichkeit sehr verschieden ist, was noch dadurch kompliziert wird, dafs bei jeder Methode ein anderes Quantum des zu prüfenden Wassers, und zwar von 1 ccm bis zu 1 l zur Benutzung gelangt.

Bezüglich des sub 1. Erwähnten bezeichnet man heute als das typische Bacterium coli ein kurzes, mehr oder minder bewegliches Stäbchen, das auf Gelatine charakteristische, weinblattförmige, bläulich durchscheinende, nicht verflüssigende Kolonien bildet und sich nach Gram nicht färbt. Dasselbe ist fakultativ anaerob, welches in zuckerhaltigen Nährböden Gärung verursacht, die sich durch Gas- (insbesondere CO_2-) und Säure- (insbesondere Milchsäure-) Bildung bemerkbar macht. Die Fähigkeit, das Neutralrot zu reduzieren und auf Kartoffeln üppig und charakteristisch zu wachsen, bildet eine weitere wichtige Eigenschaft des Bacterium coli. Die Indolbildung in Bouillonkulturen und die Tierpathogenität sind nicht unbedingt erforderliche Eigenschaften eines jeden Bacterium coli-Stammes, denn es ist zweifellos festgestellt, dafs echte Kolistämme bestehen, welche die eine oder die andere der letztgenannten Eigenschaften entbehren.

Was die sub 2. angeführten, zur Isolation des Bacterium coli aus dem Wasser dienenden Methoden betrifft, so setzt sich die Mehrzahl derselben aus zwei Operationen zusammen:

a) aus einer Anreicherung des Bacterium coli im Wasser,

b) aus der Isolation desselben auf Gelatine, Agar oder Drigalski-Conradis Platten und Prüfung der so gewonnenen Kolonien durch Anwendung diagnostischer Behelfe.

Die Anreicherung hat den Zweck, das Wachstum des Bacterium coli zu unterstützen oder dasselbe wenigstens nicht zu hindern, dagegen die übrigen im Wasser enthaltenen Mikroben im Aufwachsen zu hemmen, was durch Zusatz von Chemikalien, durch saure oder alkalische Reaktion, durch Anwendung einer höheren Temperatur bei der Anreicherung, oder durch verschiedene Kombinationen der genannten Mittel erzielt wird.

Ich habe längere Zeit hindurch vier von diesen Methoden verglichen, und zwar habe ich mit denjenigen von Parietti(6), Levy und Bruns(7), Lignièr(8) und Eijkman (l. c.) gearbeitet. Was die übrigen Methoden betrifft, so verweise ich wiederum auf die Arbeiten von Kaiser, Eijkman und Christian hin, in welchen dieselben beschrieben und besprochen werden.

Die Methode Pariettis empfiehlt folgende Anreicherung des Bacterium coli: Drei Eprouvetten, die gleiche Mengen steriler Bouillon enthalten, werden mittels einer wässrigen Lösung von 5 proz. Phenol und 4 proz. konz. Salzsäure so angesäuert, dafs zum ersten Röhrchen 3, zum zweiten 6 und zum dritten 9 Tropfen dieser Lösung zugefügt werden. Dieses Verfahren wird noch zweimal wiederholt, so dafs zu jedem Versuche drei Serien zu je drei in der angedeuteten Weise beschickten Bouillonröhrchen, also im ganzen neun Eprouvetten nötig sind. In die Röhrchen der ersten Serie werden je 4 Tropfen (ca. 0,2 ccm) der zweiten je 8 Tropfen (ca. 0,4 ccm) und der dritten je 12—16 Tropfen (ca. 0,6—0,8 ccm) des zu prüfenden Wassers zugefügt. Es ist klar, dafs hier empirisch das für das Wachstum des Bacterium coli günstigste Verhältnis von Phenol und Salzsäure gesucht wird. So hergerichtete Bouillonröhrchen bleiben dann im Thermostaten bei 37 °C 24—48 Stunden, und im Falle sich die Bouillon trübt, werden dann aus derselben Platten gegossen und auf den letzteren gewachsene Kolonien in Milch, Neutralrot-Agar und Glukose-Gelatine geprüft.

Diese Methode gibt im grofsen und ganzen befriedigende Resultate; doch ihre Empfindlichkeit ist sehr gering, was auch begreiflich ist, da erstens das Wachstum von Bacterium coli durch den Zusatz von Phenol und Salzsäure auch teilweise gehemmt wird, zweitens aber zu kleine Mengen von dem zu prüfenden Wasser in Arbeit genommen (0,2—0,8 ccm) werden. Aufserdem braucht man zur Isolierung des Bacterium coli und Prüfung auf alle Reaktionen minimal drei Tage, und zwar selbst wenn zur Isolation Agarplatten angewendet worden sind.

Die zweite Methode von Levy und Bruns zieht die Anreicherung aller bei 37 °C wachsenden, im Wasser befindlichen

Mikrobenarten vor und bewirkt dies durch Zusatz von 1 proz. Pepton und 1 proz. Kochsalz zu dem geprüften Wasser, läfst sodann diese Mischung im Brutschrank bei 37 °C 48 Stunden verharren. Von dieser Flüssigkeit werden 1—2 ccm einem Versuchstiere (gewöhnlich Meerschweinchen) intraperitoneal eingespritzt. Ist Bacterium coli anwesend, so stirbt das Versuchstier bald, und es ist dann möglich, das Bacterium coli aus der Leiche mittels Platten zu isolieren und weiteren Prüfungen zu unterziehen.

Diese Methode basiert auf der Tierpathogenität des Bacterium coli; wie ich aber oben erwähnt habe, mufs nicht jeder Stamm des echten Bacterium coli für Tiere pathogen sein, und folglich kann es bei der Durchführung dieser Methode vorkommen, dafs das Versuchstier am Leben bleibt, wenn auch das geprüfte Wasser einen echten, aber nicht pathogenen Stamm des Bacterium coli enthalten hat. Weiterhin finden im Peritoneum auch andere im Wasser enthaltene Mikroben für ihr Wachstum günstige Bedingungen, besonders die Fäulnisorganismen (Bacterium proteus), welche dann die Isolation des Bacterium coli erschweren oder sogar ganz unmöglich machen. Auch im besten Falle, wenn die Isolation gelingt, ist diese Methode zu langwierig; sie erheischt mindestens 4 Tage, vorausgesetzt, dafs das Versuchstier in 24 Stunden stirbt, und dafs zur Isolation Drigalski-Conradis Platten angewendet werden.

Bei der dritten Methode von Lignier wird ein aus »süfsem« Heu bereitetes Infusum als Nährflüssigkeit angewendet; (600 g Heu auf 5 l Wasser); dieses wird im Autoklaven sterilisiert und mit dem geprüften Wasser so vermengt, dafs auf 3 Volumen Wasser 1 Volumen Heuinfusum kommt. Diese Mischung wird dann bei Bruttemperatur 24 bis 48 Stunden gehalten und nachher auf Platten weiter verarbeitet. Die saure Reaktion und der Tanningehalt des Heuinfusums sollen nur dem Bacterium coli Wachstum gewähren, das Vermehren der andern Mikroben dagegen zurückhalten.

Kaiser arbeitete mit dieser Methode und gibt ihr ein gutes Zeugnis, mufs jedoch gleichzeitig gestehen, dafs ihn dieselbe in einigen Fällen gänzlich im Stiche gelassen hat.

Einen grofsen Nachteil dieser Methode bildet die Unmöglichkeit, das zur Bereitung der Nährflüssigkeit verwendete Ausgangsmaterial, das »süfse« Heu, in präziser Weise zu definieren, denn die Zusammensetzung desselben ist Sache des Zufalls und folglich variiert auch die Zusammensetzung des Heuinfusums sehr.

Bei den mit Hilfe dieser Methode unternommenen Versuchen habe ich wahrgenommen, dafs nicht nur das Bacterium coli, sondern auch zahlreiche andere Mikroben das Heuinfusum gut vertragen und sich darin so vermehren, dafs hiedurch das Bacterium coli manchmal gänzlich unterdrückt und seine Isolation unmöglich gemacht wird. Diese Erfahrung habe ich bei dem im Herbste v. Js. in der Nähe der Sofieninsel in Prag geschöpften Moldau-Wasser gemacht. In diesem Falle war es ein, im Moldau-Wasser zeitweise vorkommendes, kurzes, unbewegliches Stäbchen, welches die Gelatine-Platten so schnell peptonisiert hat, dafs dieselben in 24 bis 48 Stunden bei spärlicher Besäung gänzlich verflüssigt waren, und welches durch sein energisches Wachstum im Heuinfusum die Kolibazillen gänzlich unterdrückt und die Anwendung dieser Methode unmöglich gemacht hat. Die Isolation des Bacterium coli ist in diesem Falle mit Pariettis Methode gut gelungen.

In der letzten Zeit hat Eijkman eine neue Methode zur Feststellung fäkaler Verunreinigungen des Wassers vorgeschlagen: Zu dem geprüften Wasser wird $^1/_8$ seines Volumens Flüssigkeit zugegeben, die 10 proz. Pepton, 10 proz. Glukose und 5 proz. Kochsalz enthält; diese Mischung wird in Gärkölbchen gefüllt und in einen auf 46^0 gehaltenen Thermostat gestellt. Ist das Wasser fäkal verunreinigt, so zeigt sich gewöhnlich im Laufe von 24, längstens von 48 Stunden starke Gasbildung, und der Inhalt der Kölbchen trübt sich diffus. Bei reinen, einwandfreien Wässern kommen diese Reaktionen nicht zum Vorschein, und erst nach 48 Stunden trübt sich die Flüssigkeit im offenen Arm des Röhrchens unwesentlich. Ist das Ergebnis des Versuches positiv, so findet man bei Untersuchung der getrübten Flüssigkeit unter dem Mikroskope, dafs dieselbe schwach be-

wegliche Stäbchen und hie und da andere Mikroorganismen als Verunreinigung enthält; oft stellt sie aber beinahe eine Reinkultur eines Mikroben dar, der durch seine Erscheinung und Eigenschaften dem Bacterium coli entspricht, wie ich mich öfters durch Isolation auf Platten überzeugt habe.

Man kann allerdings nicht die Behauptung aufstellen, dafs es sich hier immer um ein echtes Bacterium coli handelt und Eijkman selbst macht darauf aufmerksam, dafs er im Humus und Kompost Mikroben gefunden habe, welche bei 46° eine starke Gasbildung zeigen, die jedoch keine echten B. coli sind. Es wurde jedoch nicht nur durch Eijkman, sondern auch durch Christian ganz zweifellos empirisch festgestellt, dafs einwandfreies Wasser niemals bei 46° und bei den oben angeführten Bedingungen die genannte Reaktion (Gasbildung) zeigt, fäkal verunreinigtes Wasser dagegen zeigt unter den gleichen Verhältnissen stets eine reichliche Gasbildung, wovon ich mich auch durch eigene Versuche überzeugt habe.

Manchmal bildet sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit im offenen Arm des Gärkölbchens ein Häutchen, welches sich bei der mikroskopischen Untersuchung neben einigen wenigen andern Mikroorganismen als aus sporenbildenden, dicken Stäbchen zusammengesetzt erweist. Das Wachstum der letzteren ist durch den Zutritt der freien Luft bedingt, denn in dem geschlossenen Arm sind sie nicht vorzufinden und nehmen folglich auf das Resultat des Versuches keinen Einflufs. Eijkman meint, dafs die Buttersäurebazillen dieselben Erscheinungen wie das Bacterium coli hervorrufen könnten; zieht man jedoch die langsame Vermehrung der Buttersäurebazillen in Betracht, so wird man kaum voraussetzen können, dafs dieselben in der kurzen Dauer des Versuches (ca. 24 Stunden) so anwachsen, um zu einem Irrtum Anlafs geben zu können. Bei meinen Versuchen bin ich ihnen nie begegnet und auch Christian hat sie nie vorgefunden.

Bei der Prüfung verschiedener Wässer konnte ich nach positivem Ausgange des Versuches den gasbildenden Mikroben stets mit gutem Erfolge auf Platten isolieren, mit Hilfe diag-

nostischer Mittel prüfen und bei demselben in den meisten Fällen alle Eigenschaften des Bacterium coli vorfinden. Durch diese Erfolge hat die Methode Eijkmans in mir ein grofses Vertrauen erweckt. Die Empfindlichkeit derselben ist eine so grofse, dafs ich noch in 0,01 ccm des bei der Karlsbrücke in Prag geschöpften Moldauwassers eine deutlich positive Reaktion wahrnehmen konnte. Christian hat festgesetzt, dafs 0,000001 ccm der berliner Kanaljauche, 0,0001 ccm filtriertes Rieselwasser und 0,001 ccm Spreewasser stets einen positiven Ausfall der Proben gegeben haben.

Neumann meint, »dafs durch die Bebrutung bei 46° in Zuckerbouillon sicherlich sehr viele Bakterien zurückgehalten oder abgetötet werden, dafs also eine gewisse Auswahl statthat. Ob aber dabei auftretende Vergärung als solche bereits für das Vorhandensein von Koli als beweisend anzusehen ist, kann erst eine weitere gröfsere Anzahl von Untersuchungen lehren, bei denen der Kolikeim noch regelmäfsig zu isolieren ist.«

Meiner Ansicht nach wird man auch bei einer grofsen Zahl von Versuchen nicht weiter kommen, denn, wie ich schon einmal erwähnt habe, hat **Eijkman** selbst nachgewiesen, dafs die Gasbildung bei 46° auch durch Mikroben, die **kein echtes Bacterium coli sind**, hervorgerufen werden kann; leider führt er nicht an, welche typische Reaktion gefehlt hat. Ich halte es für vorteilhafter, diese Methode derart zu modifizieren, dafs sie zu erkennen gestattet, ob der bei 46° Gas bildende Mikrobe auch Säure bildet und das Neutralrot reduziert. Dann erscheinen alle typischen Reaktionen des Bacterium coli in einem, in 24 Stunden beendeten Versuche verbunden.

Die Feststellung der Säurebildung war im grofsen und ganzen einfach, und zwar habe ich dieselbe nach Beendigung des Versuches durch Zusatz blauer Lackmustinktur von bestimmter Alkalität (deren Herstellung ich später angeben werde) zu der gasbildenden Flüssigkeit durchgeführt.

Von besonderer Wichtigkeit war nun die Lösung der Frage, wie die Fähigkeit des gasbildenden Mikroben das Neutralrot zu reduzieren bestimmt werden könnte, welche Eigenschaft, wie Rothberger(9) zeigte, für das Bacterium coli so charakteristisch ist. Die Reduktion kann allerdings nur im geschlossenen Arm geschehen, in welchem der Zutritt des Luftsauerstoffes beschränkt, und die Rück-Oxydation des reduzierten Farbstoffes nicht möglich ist.

Gleich die ersten Versuche haben gelehrt, dafs bei den, durch die Eijkmansche Methode statuierten Bedingungen die Entfärbung nicht stattfindet. Ich habe weiterhin festgesetzt, dafs das Bacterium coli in keinem der üblichen, flüssigen Nährböden das Neutralrot entfärbt; dies trifft einzig nur in der gewöhnlichen, nach bekannter Vorschrift aus Fleisch bereiteten Bouillon ein, so dafs dieselbe nicht einmal durch eine aus Liebigs Fleischextrakt bereiteter Bouillon ersetzt werden kann. Dieser interessante Umstand ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dafs der konzentrierte Liebigs Fleischextrakt infolge der zum Verdampfen (bei der Fabrikation) benutzten und längere Zeit hindurch einwirkenden höheren Temperatur in seiner chemischen Beschaffenheit von dem aus frischem Fleische bereiteten Extrakt bedeutend verschieden ist.

Diese Erfahrungen haben mich belehrt, dafs die gewöhnliche aus Fleisch bereitete Bouillon als Nährflüssigkeit für meine Zwecke geeignet ist; da sie aber die Nährstoffe in verdünnter Lösung enthält, und durch Zusatz derselben das geprüfte Wasser eine zu grofse Verdünnung erfahren möchte, habe ich eine Bouillon von höherer Konzentration angewandt, worüber ich später Mitteilung machen werde.

Weiterhin habe ich bemerkt, dafs die Reduktion von Neutralrot durch das Bacterium coli langsamer bewirkt wird, wenn in der Bouillon Glukose mitanwesend ist; diese Erscheinung läfst sich in der Weise erklären, dafs die in der Lösung enthaltene noch nicht vergorene Glukose selbst einen Teil der Reduktionsfähigkeit des Bacterium coli verbraucht und selbst, als aldehydischer Zucker in Sorbit reduziert wird. Aus diesem Grunde

habe ich für meine weiteren Versuche anstatt Glukose Mannit, einen alkoholischen Zucker, angewandt, der als solcher nicht weiter reduziert werden kann. Das Bacterium coli vergärt Mannit ebensogut wie Glukose.

Ich schreite nunmehr zur Beschreibung der Modifikationen der Eijkmanschen Methode, wie ich sie auf Grund der oben angeführten Erfahrungen ausgebildet habe.

Die Bereitung von Mannit-Bouillon ist die folgende:

Zur Bereitung von 1 l dieser Nährflüssigkeit wird 1 kg feingehacktes Rindfleisch mit 2 l Wasser 24 Stunden mazeriert und dann durch Leinwand filtriert und ausgepreſst; zu dem auf solche Weise gewonnenen 1 l Fleischextrakt werden 25 g Pepton Witte, 15 g Kochsalz und 30 g Mannit hinzugefügt und weiter wie bei der Bereitung der gewöhnlichen Bouillon vorgegangen; d. h. die Flüssigkeit wird 1 $^1/_2$ Stunden über einer Flamme gekocht, mit Sodalösung neutralisiert, sodann filtriert und 2 Stunden im strömenden Dampf sterilisiert.

Diese Bouillon wird mit dem geprüften Wasser in der Weise vermengt, daſs auf 2 Volumen Wasser 1 Volumen Bouillon kommt; also z. B. auf 100 ccm Wasser 50 ccm Mannit-Bouillon. Zu dieser Mischung werden nun 2 % einer sterilisierten Wasserlösung von Neutralrot (0,1 g Neutralrot in 100 ccm destilliertes Wasser), also auf je 150 ccm der Mischung 3 ccm der Neutralrotlösung beigefügt. Nun wird diese Flüssigkeit in 7—10 Gärröhrchen[1]) von je 15—20 ccm Inhalt gefüllt und im Thermostaten bei 46° gehalten.

Diese Temperatur muſs mit Hilfe eines präzisen Thermometers kontrolliert werden; sie darf niemals 46° übersteigen und auch nie unter 45,5° sinken, was bei der Anwendung eines empfindlichen Regulators gut gelingt.

---

1) Gärröhrchen kann man aus Glasröhren herstellen, indem man dieselben knieartig in einem Winkel von ca. 60° umbiegt und an einem Ende zuschmilzt. Diese Röhrchen vertragen die Sterilisation durch Hitze gut und sind einfach und billig herzustellen.

Ist das Bacterium coli im geprüften Wasser anwesend, so findet man nach 12—24 Stunden den geschlossenen Arm des Gärröhrchens teilweise mit Gas gefüllt, die Flüssigkeit diffus getrübt, und ihre früher rote Farbe erscheint in eine gelbe, grünfluoreszierende verwandelt.

Dann werden mit einer Pipette 10 ccm der Flüssigkeit aus dem Gärröhrchen entnommen und in einer Eprouvette mit 1 ccm alkalischer Lackmustinktur versetzt. Die letztere wird bereitet, indem man zu 100 cm Lackmustinktur von Kahlbaum (dient auch zur Bereitung des Drigalski-Conradi-Agars) 2 ccm Normal-Natronlauge beifügt.

Reagiert die dem Gärröhrchen entnommene Flüssigkeit entsprechend sauer, so entsteht nach Zugabe der Lackmustinktur eine rein rote Färbung; ist die Flüssigkeit neutral oder schwach sauer, so färbt sie sich violett.

In manchen Fällen könnte man wohl eine Lackmustinktur von gröfserer Alkalität anwenden; ich habe jedoch eine solche wählen müssen, die für alle Fälle geeignet erscheint. Die Menge der gebildeten Säure ist nämlich teils von der Menge des Bacterium coli im Wasser, teils von der Dauer des Versuches abhängig. Auch die temporäre Härte des Wassers wirkt auf den resultierenden Säuregehalt, denn das Kalzium- und Magnesiumbikarbonat, welche die temporäre Härte verursachen, neutralisieren einen Teil der gebildeten Säure.

Die Reduktion von Neutralrot verzögert sich manchmal; doch verrät, selbst wenn dieselbe noch nicht vollendet ist, schon die Fluoreszenz der Flüssigkeit eine teilweise Entfärbung. Um in solchen Fällen die vollständige Entfärbung zu erzielen, muss das Röhrchen noch einige weitere Stunden im Thermostat bei 46° gehalten werden.

Enthält das geprüfte Wasser kein Bacterium coli, dann bleibt die Flüssigkeit klar, rot gefärbt, neutral, und es bildet sich kein Gas.

Es ist vorteilhaft, zur Probe 100 ccm Wasser zu verwenden und dieselben nach Zugabe von Mannit-Bouillon und Neutralrot in 7—10 Gärröhrchen von 15—20 ccm Inhalt zu füllen.

Die hier beschriebene Modifikation der Eijkmanschen Methode bietet den Vorteil, dafs mit Hilfe derselben in 24 Stunden die Anwesenheit des Bacterium coli im Wasser und vier charakteristische Eigenschaften desselben und zwar nachgewiesen werden können:

1. die Fähigkeit bei 46⁰ zu wachsen,
2. » » » » Gas zu bilden } aus Mannit
3. » » » » Säuren zu bilden } aus Mannit
4. » » » » Neutralrot zu reduzieren.

Fehlt eine oder die andere von diesen Reaktionen, dann handelt es sich um das **echte** Bacterium coli ganz gewifs **nicht.**

Mit Hilfe dieser modifizierten Methode ist es also möglich solche Fälle auszuschalten, in welchen das geprüfte Wasser einen bei 46⁰ Gas bildenden Mikroben enthält, welcher aber eine oder die andere von den übrigen genannten Reaktionen nicht zeigt und folglich kein echtes Bacterium coli ist, was jedenfalls als eine wesentliche Verbesserung der Eijkmanschen Methode aufzufassen ist.

Meine Modifikation steht, wie ich mich überzeugt habe, was die Leistungsfähigkeit und Empfindlichkeit anbelangt, mit der Eijkmanschen auf der gleichen Stufe, und könnte ich diesbezüglich nur das wiederholen, was ich darüber oben erwähnt habe.

Zum Schlufs gestatte ich mir, Herrn Prof. Dr. G. Kabrhel für die Anregung zu dieser Arbeit und für sein Interesse für ihren Fortgang meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literatur.

1. Kabrhel, Monatsschrift für öffentliche Gesundheitspflege 1898. Nr. 4. etr. 89.
2. Kaiser, Archiv f. Hygiene, Bd. LII, S. 121.
3. Christian, Archiv f. Hygiene, Bd. LIV, S. 386.
4. Eijkman, Zentralblatt f. Bakteriologie, Bd. XXXVII, S. 742.
5. Neumann, Archiv f. Hygiene, Bd. LIX, S. 174.
6. Parietti, Riv. d'igiene e sanità publica. 1890 zitiert nach Meusburger und Rambousek. Zentralblatt f. Bakteriologie, Bd. XXXII, S. 476.
7. Levy und Bruns, Archiv f. Hygiene, Bd. XXXVI, S. 178.
8. Lignier, Compt. rend. de la soc. de biolog. 1894, S. 200. Zitiert nach Kaiser. (2)
9. Rothberger, Zentralblatt f. Bakteriologie, Bd. XXIV, S. 513.

Überempfindlichkeitserscheinungen nach Hefeinjektion.

Von

Dr. **Oskar Axamit.**

(Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität in Prag. Vorstand: Prof. F. Hueppe.)

Mit Tafel I.

In letzter Zeit mehren sich Arbeiten, die sich mit der Frage der Überempfindlichkeit, die jedenfalls zu den interessantesten Erscheinungen zählt, beschäftigen. Der genannte paradoxe Körperzustand ist sowohl theoretisch als praktisch von eminenter Bedeutung. Unter dem Worte »passive Immunität« stellen wir uns den Zustand verminderter Empfindlichkeit (Unterempfindlichkeit) gegen die die Krankheit verursachenden Infektionsstoffe vor, den wir künstlich durch Injektionen geeigneten derartiger Stoffe in steigenden Dosen an Tieren hervorrufen können. Falls jedoch das schon immunisierte Tier plötzlich nach einer Dosis zugrunde geht, die der normale, nicht immunisierte tierische Organismus folgenlos verträgt, haben wir das Gegenteil dessen, was wir erreichen wollten, einen Zustand erhöhter Empfindlichkeit — Überempfindlichkeit — erzielt. Und doch geht beides — die Unter- und die Überempfindlichkeit — Hand in Hand, wie es vorauf v. Pirguet wieder hinwies bei der Vakzination.

»Der vor kurzer Zeit vorgeimpfte Organismus erscheint gegenüber der Erstimpfung überempfindlich, denn er reagiert viel schneller auf die Infektion, und gleichzeitig ist er geschützt,

denn bei ihm erreicht der vakzinale nur eine geringfügige lokale Ausdehnung, alle Allgemeinerscheinungen bleiben ihm erspart.«

Aber auch praktisch kann der obenerwähnte Zustand von grofser Bedeutung sein; denn nach einer Infektion, die unter im ganzen unbedeutenden Symptomen verläuft, kann der tierische Organismus einer Reinfektion ausgesetzt sein, welche infolge der bestehenden Überempfindlichkeit verhängnisvoll werden kann.

Vor dem Berichte über die angestellten Versuche möge in einem kurzen Überblicke die wesentliche Literatur des Gegenstandes wieder gegeben werden.

Die bisherigen Ermittelungen beziehen sich teils auf die Wirkung von gelösten Substanzen, teils auf die von ungelösten, geformten Stoffen. Erstere können wieder von vornherein schon für normale Tiere giftig sein, oder sie wirken erst im überempfindlichen Zustande als heftige Gifte, während sie ohne diesem mehr minder gut vertragen werden.

Zur ersten Gruppe gehören namentlich die Versuche Richets (1), der fand, dafs nach der Injektion von 0,2—0,18 g Aktiniengift pro 1 kg Körpergewicht Hunde nach 10 Stunden zugrunde gingen. Injizierte er jedoch 0,1 g pro 1 kg Körpergewicht und nach 22 Tagen dieselbe Dosis, so starben die Tiere binnen 25 Minuten. Richet legt dieser Überempfindlichkeit eine grofse Bedeutung bei und nennt den Zustand Anaphylaxis.

Behring beobachtete, dafs hoch gegen Diphtherie immunisierte Pferde nach einer relativ unbedeutenden Toxindosis plötzlich unter schweren Vergiftungssymptomen starben.

Diese »paradoxe Reaktion« haben Behring und Kitashima (2) eingehender studiert, indem sie wiederholt sehr geringe Dosen von Tetanustoxin injizierten (etwa $\frac{1}{400\,000}$ der tödlichen Dosis). Es stellte sich heraus, dafs die Tiere dann starben, obwohl die Gesamtmenge des injizierten Giftes kaum $\frac{1}{400}$ der sonst tödlichen Dosis erreichte.

Zu ähnlichen Resultaten ist auch Knorr (3) gelangt.

Ferner beobachtete Kretz(4), dafs gegen Tetanus immunisierte Pferde einer anscheinend unschädlichen Dosis eines Gemisches von Toxin mit Antitoxin erliegen können. Diese paradoxe Reaktion wäre eine einseitige Giftbindung an die empfindlichen Zellen, welche durch Rezeptorenvermehrung für das Gift avider geworden sind, eine Giftbindung, gegen deren deletäre Folgen die freien Rezeptoren im Serum natürlich nicht schützen können, da ihre giftbindende Wirkung als zu wenig avid nicht zur Geltung kommt.

Während es sich bei diesen Versuchen um die Anwendung an sich hochgradig giftiger Stoffe handelte, bemerkte man auch Erscheinungen von Überempfindlichkeit nach Einspritzung von Flüssigkeiten, die an sich relativ unschädlich sind und erst nach wiederholter Einführung in den Organismus die verderblichsten Wirkungen entfalten. Eingehende Studien darüber verdanken wir den Arbeiten von Pirguet und Schick (5).

Diese beobachteten, dafs bei Rindern einige Tage nach der Injektion von fremdem Blutserum lokale (Erytheme, Oedeme) und allgemeine Symptome einer Erkrankung auftraten. Den Zeitraum von der Injektion des Serums bis zum Eintreten der Serumkrankheit bezeichneten sie als Inkubation. Wurde während dieser eine zweite Injektion vorgenommen, so erfolgte keine besondere Reaktion. Wurde hingegen erst längere Zeit nach der Erstinjektion eine neuerliche Serumeinspritzung gemacht, so folgten die Erscheinungen der Serumkrankheit fast ohne jede Inkubationszeit.

Diese sofortige Reaktion erreicht zwischen der 3—6 ten Woche ihr Maximum, nimmt nach 4 Monaten ab und verschwindet etwa im 9 ten Monate. Doch bleibt auch dann noch der Organismus jahrelang im Zustande einer gewissen Überempfindlichkeit, denn neuerliche Injektionen des betreffenden Serums können die obenerwähnte Reaktion in einer kürzeren Inkubationszeit sls früher hervorrufen.

Diesen interessanten Zustand suchen die erwähnten Autoren so zu erklären, dafs das Serum zwar für den Organismus relativ

unschädlich ist, jedoch eine Produktion von Antikörpern verursacht, die das Antigen in eine giftige Modifikation umbilden, welche dann dadurch die Krankheit hervorruft.

Verbleiben aber die erwähnten Antikörper bis zur Zeit der Zweitinfektion im Organismus, so wandeln dieselben das neue Antigen sofort in die hypothetische schädliche Modifikation um, und es tritt Erkrankung, eventuell der Tod ein. Pirguet schlägt die Einführung des Wortes »Allergie« statt »Überempfindlichkeit« vor, das überempfindliche Tier wird »allergisch«, und statt des Wortes »Antigen« will Pirguet »Allergen« eingeführt wissen.

Ziemlich gleichzeitig hat Arthus(6) Überempfindlichkeit bei Kaninchen durch Reinjektion von Pferdeserum beschrieben.

In der letzten Zeit haben Rosenau und Anderson (7) die Reihe der Forschungen durch Angaben von groſser Überempfindlichkeit bei Meerschweinchen gegen Pferdeserum vermehrt. Sie zeigten weiter, daſs Meerschweinchen durch zehnmalige tägliche Injektion von Pferdeserum gegen spätere Reinfektion immun werden können.

Einen Übergang zwischen der Überempfindlichkeit, die nach Injektion gelöster Substanzen eintritt, zu jener, welche auf die Einführung geformter Elemente zustande kommt, bildet die Überempfindlichkeit gegen Endotoxine, die A. Wolff (8) zum Gegenstande experimenteller Studien und theoretischer Erwägungen gemacht hat. Wolff fand, daſs nach Injektion fremder Zellarten, besonders Spermatozoen, ausgesprochene Überempfindlichkeit eintrat. Da diese ungefähr Hand in Hand geht mit der Ausbildung spezifischer Zytolysine, so liegt es nahe, einen ursächlichen Zusammenhang beider Erscheinungen anzunehmen. Im Gegensatze zu von Pirguet und Schick glaubt Wolff nicht so sehr, daſs der gebildete Antikörper (das Zytolysin) das Antigen (die Zelle) erst giftig macht; er erleichtert nur deren Resorption durch die Auflösung, die er herbeiführt und veranlaſst so Vergiftungserscheinungen. In der Folge hat Wolff seine Anschauung auch auf gelöste Eiweiſskörper ausgedehnt und in mehrfachen Veröffentlichungen auf die Versuche von v. Pirguet und Schick

angewendet. Auch für Überempfindlichkeit nach Bakterieninjektion gibt die Auffassung Wolffs eine Erklärung.

Was das Studium der Überempfindlichkeit, hervorgerufen durch spezifische Mikroorganismen betrifft, so sind zuerst die Arbeiten über die Experimente mit Mycobacterium tuberc. anzuführen. Schon Koch hat darauf aufmerksam gemacht, dafs die Infektion eines bereits tuberkulösen Meerschweinchens mit tuberkulösem Material einen anderen Verlauf nimmt als die eines noch nicht geimpften.

Courmont (9) bereitete sich Filtrate junger Tuberkelbazillenkulturen, mit denen er dann Meerschweinchen und Kaninchen impfte — gestützt auf die Ansicht Arloings, dafs Tuberkelbazillen und andere pathogene Mikroorganismen gewisse Stoffe ausscheiden, die den tierischen Organismus derart beeinflussen, dafs derselbe eine Zweitinfektion mit derselben Art von Mikroben schwer verträgt.

Die von Courmont geimpften Kaninchen und Meerschweinchen blieben ohne Reaktion am Leben, infizirte er aber dieselben nach 20 Tagen mit tuberkulösem Material eines Meerschweinchens, so starben die Tiere, und zwar Meerschweinchen nach 15, Kaninchen nach 23 Stunden. Die Erklärung dieser Tatsache stützt der erwähnte Autor auf die Ausschaltungstheorie, dafs nämlich gewisse Schutzstoffe durch Injektion von bazillären Produkten ausgeschaltet werden.

Strauss und Gamaleia (10) richteten ihre Experimente so ein, dafs sie getötete Tuberkelbazillen Tieren injizierten, ohne Reaktion zu bekommen; nach einer Reinjektion sind diese Tiere akut zugrunde gegangen. Ähnliche Experimente stellten Babes und Proca (11) an.

Von grofser Wichtigkeit sind die Arbeiten Detre-Deutschs (12). Derselbe injizierte tuberkulösen Meerschweinchen kleine Bazillenmengen subkutan und fand lokale Veränderungen, die sich durch ein Ödem manifestierten, und allgemeine, indem die behandelten Tiere längere Zeit fieberten. Die Erscheinung ist seiner Meinung nach so zu erklären, dafs die Bakterien Giftstoffe, sogenannte Leukotoxine, produzieren, die beim tuberkulösen

Tiere in genügender Menge vorhanden sind, um die Leukozytose vom Orte der Reinfektion fernzuhalten.

Bail (13), der die Frage der Überempfindlichkeit bei der Tuberkulose eingehend studierte, impfte intraperitoneal eine Reihe von bereits tuberkulösen Meerschweinchen mit neuen Bazillen und fand, dafs dieselben sehr akut, schon nach $4\frac{1}{2}$ Stunden, starben. Die Zeit, nach welcher die Reinfektion vorgenommen wurde, wurde verschieden gewählt, der Beginn der Überempfindlichkeit läfst sich jedoch nicht genau bemessen.

Bail bestreitet nicht, dafs bei der Überempfindlichkeit besondere Wirkungen der Körpersäfte, nach Art der Zytolysine z. B., tätig seien. Er erblickt aber in diesen nicht die Hauptursache der Überempfindlichkeit, die vielmehr dadurch zustande kommt, dafs Abwehrvorrichtungen des Organismus, welche bei der ersten Injektion des Antigens dieses unschädlich machen, bei der zweiten in Wegfall gekommen sind. Jetzt kann die dem Antigen von Anfang an eigene Giftigkeit, die durch Schutzmittel des normalen Organismus verdeckt wird, zur vollen Wirkung gelangen, besonders wenn Antikörper, etwa Zytolyne im Sinne A. Wolffs, dessen Resorption erleichtern.

In das Gebiet der Überempfindlichkeit bei Tuberkulose fallen auch die Arbeiten von B. Schick, Löwenstein und Rappaport, Möller, Löwenstein und Ostrowsky.

Die Symptome der Überempfindlichkeit bei Syphilis haben Finger und Landsteiner (14) studiert und fanden, dafs Reinfektion bei Syphilis in allen Stadien eine verkürzte Inkubationszeit zur Folge hat.

Bei tertiärer Syphilis zieht die Reinfektion unmittelbare Reaktion nach sich, die sich durch ein Erythem, Infiltration und Zerfall in der Mitte kenntlich macht.

Die Immunität ist demzufolge nur eine relative. Das wird auch durch die Erfahrung an der Klinik bestätigt; es findet nämlich innerhalb der ersten bis zweiten Inkubationsperiode Autoinokulation von dem Primäraffekte oder von fremdem Virus statt, die sich durch eine verkürzte Inkubationszeit manifestiert.

Mit der Überempfindlichkeit bei Diphtherie hat sich Rist (15) beschäftigt.

Die Frage der Überempfindlichkeit bei Actinomyces asteroides Eppinger hat Nakayama(16) studiert; der fand, dafs Meerschweinchen, die im Intervalle von 6—7 Tagen mit 3 Agarkulturen + 3,5—5 ccm NaCl-Lösung geimpft wurden, nach 5 bis 57 Stunden (je nach den Intervallen zwischen der Erst- und Zweitinfektion) zugrunde gehen. Auf Einzelheiten der Arbeit wird noch später eingegangen, hier sei nur erwähnt, dafs der Autor dieses Phänomen durch ein Agens erklärt, »das, ohne schon in der künstlichen Kultur vorhanden zu sein, erst im Tierkörper selbst entsteht. Dabei kann entweder an eine Art Sekretionsprodukt der Pilze gedacht werden, oder an eine Modifikation ihrer Substanz, für deren Entstehung aber die Annahme besonderer Reaktionsprodukte des Organismus kein Erfordernis darstellt.«

»Dieses Agens müfste folgende Eigenschaften besitzen:

1. Es vermag an und für sich den Tierkörper nicht zu schädigen.
2. Seine Wirkung ist nicht von unbegrenzter Dauer, sondern erreicht, von einem indifferenten Nullpunkte ausgehend, eine gewisse Höhe, von der ein allmähliches Absinken erfolgt.
3. Es mufs die Tätigkeit besitzen, den vorher zwar nicht unschädlichen, aber doch nicht zu tödlicher Wirkung befähigten Aktinomycespilz für den Organismus giftig zu machen.
4. Die Schädigung der Abwehrvorrichtungen ist nur bis zu einem gewissen Grade spezifisch.

Diese Forderungen werden sämtlich erfüllt, wenn man auch für den Aktinomyces die Bildung von Agressinen im Tiere annimmt.«

Der erwähnte Autor steht mit seiner Erklärung demnach zu der Professor Bails am nächsten.

Die kurze Übersicht, welche auf Vollständigkeit der anzuführenden Literatur keinen Anspruch macht, zeigt deutlich, dafs

die Überempfindlichkeit, in der man lange Zeit nur ein interessantes, schwer zu erklärendes Phänomen sah, tatsächlich eine sehr weite Verbreitung besitzt. Es ist unverkennbar, dafs sie zu den grofsen Problemen der bakteriologischen Forschung, der Erklärung der Infektion und der Immunität in Beziehung steht, was durch die Pirqusche Bezeichnung »Allergie« sehr glücklich zum Ausdruck kommt. Es ist weiter sehr wahrscheinlich, dafs die Überempfindlichkeit, obwohl sie durch anscheinend recht verschiedene Dinge hervorgerufen wird und dementsprechend auch verschiedene Formen zeigt, sich auf ein einheitliches Prinzip der Erklärung zurückführen lassen wird. Vorläufig allerdings gehen die Erklärungsversuche nach verschiedenen Richtungen auseinander, wohl deshalb, weil der gesamte Komplex der Beobachtungen noch schwer von einem einzigen Gesichtspunkte aus aufzufassen ist.

Unter solchen Umständen ist es vor allem notwendig, das Material zu vermehren und Fälle, wo sich Überempfindlichkeit feststellen läfst, genau zu studieren. Eine möglichst vollständige Darstellung der Versuchsergebnisse soll Anhaltspunkte für die Beurteilung der gewonnenen Resultate ergeben.

Angeregt durch Herrn Prof. Bail habe ich die Verhältnisse einer durch Blatomyzeten entstandenen Überempfindlichkeit bei Meerschweinchen und Kaninchen studiert.

Zu diesem Zwecke wurden zuerst aus einem Falle menschlicher Hautmykosis gezüchtete Sprofspilze gewählt, die nur geringe alkoholische Gärung hervorrufen und nach ihrer sonstigen Form und Weise als eine Torulaart bezeichnet werden müssen.

Die einzelnen Zellen zeigen bald eine ovale bis kugelförmige Form, bald wachsen sie zu ansehnlichen Fäden aus. Die jungen Zellen lassen ein einfach konturiertes, glänzendes, kernloses Protoplasma erkennen. Später bekommen dieselben eine Membran, und es gelingt zuweilen, in frischen Präparaten Kerne zu erkennen. Dieselben wurden durch Färbung nach Möller deutlich dargestellt. Die Vermehrung findet durch Sprossung statt. In Bierwürze tritt bei 37° C eine schwache Gärung ein, deren Produkte

Alkohol und CO_2 sind. Die Blastomyzeten vermehren sich dabei nur einige Tage hindurch, und die Gärung sowie die Vermehrung ist bald zu Ende. Dieselben bevorzugen sauere oder zuckerhaltige Nährböden und wachsen bei Zimmertemperatur besser als bei Bruttemperatur, obwohl sie bei der letztgenannten auch ganz gut gedeihen. Auf Agarplatten bilden sie undurchsichtige, dicke Kolonien, deren Randzone aus sichtbaren, runden Kugeln besteht und schon bei schwacher Vergröfserung Unmassen von Hefezellen, aus denen sie zusammengesetzt sind, erkennen lassen. Die Agarstrichkulturen zeigen ein üppiges Wachstum und bilden einen dicken, weifsen, saftigen Belag. Das Kondenswasser bleibt klar, und es bildet sich ein weifser Bodensatz. Im Würzgelatinestiche wachsen sie in nagelförmiger Gestalt, wobei der Stich fadenförmig, gekörnt, die Auflage weifs und erhaben ist und bis gegen den Glasrand vordringt Die Gelatine wird nicht verflüssigt.

Die eben beschriebenen Blastomyzeten scheinen für Meerschweinchen und Kaninchen nicht pathogen zu sein.

Zuerst wurden Vorversuche angestellt, die später noch erwähnt werden sollen, und aus denen sich ergab, dafs die Meerschweinchen 2—4 aufgeschwemmte Agarkulturen intraperitoneal, ohne Symptone einer Erkrankung zu zeigen, ertragen. Die kleinste zum Hervorrufen des Zustandes der Überempfindlichkeit genügende Menge wurde mit 1 Kultur, die Intervalle zwischen der Erst- und Zweitinfektion mit 6 Tagen bestimmt.

Was die Technik der Injektionen anbelangt, wurde eine Reihe von Tieren mit gewaschenen, lebendigen Blastomyzeten (1 Agarkultur + 2 ccm NaCl-Lösung) intraperitoneal geimpft, bei einer anderen Reihe von Meerschweinchen wurden durch Azeton abgetötete Blastomyzeten benutzt; dies geschah so, dafs eine gewaschene, abzentrifugierte Agarkultur eine Stunde lang mit Azeton behandelt wurde. Dann wurden die Blastomyzeten so lange gewaschen, bis der Azetongeruch vollkommen verschwunden war. Die dann abzentrifugierten, abgetöteten Hefezellen wurden in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und intraperitoneal injiziert.

Von Stunde zu Stunde wurde das in der Bauchhöhle entstandene Exsudat mittes einer Kapillare entnommen und zuerst im hängenden Tropfen, dann in gefärbten Präparaten beobachtet. Die Resultate dieser Kapillarentnahme sind in den nachstehenden Tabellen ausgeführt.

Tabelle I.

Nr.	Erst-injektion	Verlauf	Zweit-injektion	Verlauf	Sektionsbefund und Bemerkungen
1. 325 g	1 Agarkult.+ 2 ccm Na Cl-lösung	Das Tier zeigt unmittelbar nach der Injektion eine starke peritoneale Reizung, erholt sich jedoch nach 6 Stdn. und bleibt am Leben. Kapillarentnahmen 10 Min. nach der Injektion: Massenhafte Blastom. öfters i. Sprofsverbänd. Fast keine Leukozyten. Nach 1 Stunde: Blastom. in grofser Zahl vorhanden, teilw. Häufchen bildend. Leukozyt. spärlich, desquamierte Epithelien. Nach 2 Stunden: Zahlreiche polynuklin. Leukozyten, die mehrere eingeschloss. Blastom. enthalten. Aufserdem findet man zahlreich. Leukozyten ohne Phagozytose. Freie Blastom. zahlreich. Nach 3 Stunden: Starke Leuko- u. Phagozytose (Mikrophagen). Freie Blastom. vermindert. Nach 4 Stunden: Leuko- u. Phagozytose. Blastom. einzeln zu sehen. Nach 5 Stunden: Leuko- u. Phagozytose noch stärker wie vorher, namentlich polynukl. Leukozyten sind massenhaft vorhanden.	1 Agarkult.+ 2 ccm Na Cl-lösung	Das Tier wird bald sehr krank, stirbt i. d. Nacht. Kapillarentnahme direkt nach der Injektion: Reine Kultur v. Blastom., teilw. in Klumpen. Spärl. Leukozyt. Nach 1 Std.: Zahlr. Leukozyt., die teilw. Phagozytose zeigen. Noch viele Blastomyz. zu sehen, namentlich die fadenbildenden. Nach 3 Stdn.: Massenhafte Leukozyten, sehr starke Phagozyt., fast keine Blastomyzeten. Nach 5 Stdn.: Reiner Eiter. Phagozytos. spärlich.	In d. Bauchhöhle befindet sich ein trübes, gelblich. Exsudat, welches einzelne mono- u. polynukleäre Leukozyten und viele Blastomyz. zeigt. Starke fibr. Verwachsung d. Baucheingeweide untereinander u. mit der Bauchwand. Das Omentum verdickt und zusammengeschrumpft. An der Leber u. Peritoneum parietale u. am Omentum befind. sich dicke Eitermassen, die aus polynukleär. Leukoz., welche hier u. da noch Phagozyt. zeigen, und aus freien Blastomyzet. bestehen. Degeneratio parench. hepatis et renum. Milz etwas vergröfsert. Aus d. Exsudat u. Eitermassen wachsen reine Blastomyz. in angelegten Kulturen. Das Blut steril.

Fortsetzung der Tabelle I.

Nr.	Erst-Injektion	Verlauf	Zweit-Inf. nach 6 Tagen	Verlauf	Ev. Drittinf. nach 6 Tagen	Verlauf	Sektionsbefund und Bemerkungen.
2. 310 g	Wie 1.	Das Tier zeigt keine auffallend. perit. Reizung, frifst u. ist vollkommen munter. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Massenhafte Blastomyzet. Spärliche Leukozyten Nach 1 Stunde: Die Blastomyz. noch sehr zahlreich, teilweise um einen Leukozyten herumgesammelt. Leukozyten spärlich, keine Phagozyten. Nach 2 Stunden: Freie Blastomyzeten zu finden. Leuko- u. Phagozytose beginnend. Nach 3 Stunden: Blastom. noch immer zu finden. Leuko- u. Phagozyt. Nach 4 Stunden: Leuko- und Phagozytose nimmt stark zu, hie und da noch Blastomyzeten. Nach 5 Stunden: Sehr spärl. Blastom.; rein. Eiter. Phagozytose noch zu sehen.	Wie 1.	D. Tier zeigt Symptome ein. schwer. Peritonitis, trotzdem erholt sich dasselbe nach 48 Stdn. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Massenhaft Blastomyz Nach 1 Stunde: Mäfsige Zahl v. Leukozyten. Einzelne Mikrophagen mit Blastomyz überfüllt. Blastomyzet. einzeln u. in Häufchen zu sehen. Nach 2 Stunden: Massenhafte Leukozyt. Starke Phagozytose Einzelne Blastomyzet. Nach 3 Stunden: Wie oben. Nach 4 Stunden: Reiner Eiter. Phagozytose. Spärliche Blastomyzeten. Nach 6 Stunden: Das Bild wie nach 4 Stunden.	1 Agarkult. + 2 ccm NaCl-lösung	Das Tier stirbt n. 22 Std. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Viele Blastom. Einzel. desquam. Epithelien. Leukozyt. sehr spärlich. Nach 1 Stunde: Zahlreiche Blastomyz. namentlich die langen mono- u. polynukleären Leukozyten. Phagozyt. Nach 2 Stunden: Die Zahl der Blastom. hat stark abgenommen. Leukozytose sehr stark, etwa d. Hälfte d. Zellen zeigt Phagozytose. Nach 3 Stunden: Blastomyzeten ziemlich verschwunden. Leuko- u. Phagozytose nimmt noch immer zu. Nach 4 Stunden: Dasselbe Bild. Nach 5 Stunden: Keine Blastom. zu find. Reiner Eiter. Phagozyt. noch bemerkbar.	In der Bauchhöhle etwa 3 ccm flüssiges, gelbliches Exsudat mit zahlreichen Flocken. An Omentum u. Darmschlingen dick. Eitermassen. Mehrere bis hanfkorngrofse, teils fibröse teils in der Mitte erweichte Knötchen in der Verwachsungszone an verschieden. Stellen des Peritoneums. Inguinaldrüsen sehr vergröfsert, einer Geschwulst ähnlich, die beim Durchschneiden eine erweichte Mittelpartie aufwies. Dieselben wurden nach gewohnten Regeln d. Technik fixiert, gehärtet und geschnitten. Über den histolog. Befund wird später die Rede sein. Parench. Degenerat. der Niere und Leber. Milz stark vergröfsert. Aus d. Exsudate u. Eitermassen wurden Kulturen angelegt, die typisch. Blastomyzeten zeigen. Das Blut steril.

Fortsetzung der Tabelle I.

Nr	Erst-infektion	Verlauf	Zweit-infektion nach 6 Tagen	Verlauf	Sektionsbefund und Bemerkungen
3.	Wie 1.	Das Tier scheint nicht besonders krank zu sein. Nach 24 Stunden vollkommen munter. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Massenhafte Blastomyzeten. Nach 1 Stunde: Einzelne Leukozyten. Zahl der Blastomyz. kaum abgenommen. Nach 2 Stunden: Leuko- und Phagozytose nimmt zu. Zahl der Blastomyzeten abgenommen. Nach 3 Stunden: Dasselbe Bild. Nach 4 Stunden: Leukozyten sehr zahlreich, fast alle zeigen Phagozytose. Nach 6 Stunden: Leuko- und Phagozytose, fast keine Blastomyzeten mehr.	Wie 1.	Das Tier ist deutlich krank und stirbt in der Nacht. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Massenhafte Blastomyzeten, teilweise in Häufchen, einzelne Leukozyten. Nach 1 Stunde: Noch viele freie Blastomyzeten; polynukleäre Leukozyten, zahlreich, z. Teil mit Blastomyceten vollgestopft. Nach 2 Stunden: Die Zahl der Blastom. geringer. Leuko- und Phagozytose. Nach 3 Stunden: Dasselbe Bild. Nach 4 Stunden: Blastomyzeten nicht mehr zu finden. Leuko- und Phagozytose sehr stark. Nach 5 Stunden: Keine Blastomyz. Reiner Eiter. Phagozytose nimmt deutlich ab.	In der Bauchhöhle flüssiges, gelbliches, dünnes Exsudat. Mikroskopisch zeigt dasselbe einzelne Lymphozyten und Leukozyten. Auf der Leber, Milz, Omentum und parietalem Peritoneum befinden sich Eitermassen, die aus Leukozyten, Makrophagen mit Blastomyzeten und Zellresten bestehen, außerdem findet man auch freie Blastomyzeten in denselben. Einige kleine, alte, narbig-fibröse Stränge am Großnetz, Verwachsungen der Baucheingeweide untereinander. Parench. Degeneration der Leber und Niere, Tumor lienis. Aus den Eitermassen, dem Exsudate und der Milz wachsen wieder Blastomyzeten am Agar. Das Blut steril.

6.	Wie 1.	Das Tier ist deutlich krank, erholt sich nach 24 Stunden. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Blastom. einzeln u. in Klumpen massenhaft vorhanden. Hier u. da ein Leukozyt. Nach 1 Stunde: Noch immer massenhafte Blastomyzeten. Leukozyten mit Phagozytose einzeln zu sehen Nach 2 Stunden: Blastomyzeten zahlreich. Leuko- und Phagozytose. Nach 3 Stunden: Noch immer viele freie Blastomyzeten. Leukozytose stark ausgeprägt, viele Mikrophagen, beladen mit Blastomyzeten. Nach 4 Stunden: Desgl. Nach 5 Stunden: Einzelne Blastom., starke Leuko- und Phagozytose. Nach 6 Stunden: Nur noch 2 Blastom.-Zellen gefunden. Leuko- u. Phagozytose reichlich. Nach 7 Stunden: Leuko u. Phagozytose. Unbestimmbare Körperchen, vielleicht Blastomyzetengranula. Nach 8 Stunden: Reiner Eiter. Phagozytose, Makrophagen vereinzelt. Nach 9 Stunden: Rein. Eiter. Hier u. da Phagozyt.	Wie 1.	Das Tier 4 Stunden nach der Injektion schwer krank, stirbt in der Nacht. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Das Bild beherrscht von freien, in Klumpen und einzeln vorkommenden Blastomyzeten. Sehr spärliche Leukozyten. Nach 1 Stunde: Blastom. sehr zahlreich. Die Zahl der Leukozyten scheint deutlich vermehrt zu sein. Phagozytose kommt vereinzelt vor. Nach 2 Stunden: Blastomzyten spärlicher. Starke Leuko- und Phagozytose. Nach 3 Stunden: Desgl. Nach 4 Stunden: Keine freien Blastomyzeten zu finden. Leuko- u. Phagozytose. Nach 5 Stunden: Desgl. Nach 6 Stunden: Desgl. Nach 7 Stunden: Massenhafte Leukozyten, Phagozytose nimmt ab, einzelne Mikrophagen befinden sich i. beginnender Entartung, ihr Plasma sieht wie verwischt aus, aus demselben scheinen freie Blastom. in Häufchen auszuwachsen. Einz. freien Blastom. wieder leicht zu finden. Nach 9 Stunden: Reiner Eiter, keine Phagozytose. Einzelne freien Blastomyzeten.	In der Bauchhöhle befinden sich etwa 5 ccm flüssiges Exsudat, welches mikroskopisch einzelne Leukozyten und hier und da freie Blastomyzeten zeigt. Die fibrösen Verwachsungen d. Baucheingeweide untereinander und mit der Bauchwand fehlen diesmal. An der Leber und an anderen Organen befinden sich dicke Eitermassen, die aus Leukozyten (polynukleären), aus einzelnen Makrophagen und zahlreichen freien Blastomyzeten bestehen. Parench. Degeneration leichten Grades. Milz mäfsig vergröfsert. Aus dem Exsudat, Eitermassen und Milz wachsen wieder reine Kulturen von Blastomyzeten. Das Blut steril.

Diese Tabelle gibt den Verlauf der Erst- und Zweitinfektion bei Anwendung lebender Hefen in Ausführlichkeit wieder. Dafs das Tier Nr. 2 die Zweitinfektion, wenn auch unter schwerer Krankheit schliefslich überstand, stellt bei dieser Torulahefe eine seltene Ausnahme dar, während es bei der später zu erwähnenden Logoshefe die Regel ist.

Es sollte weiter untersucht werden, ob die Exsudatflüssigkeit, welche sich in der Bauchhöhle überempfindlich gewordener Tiere mehr minder reichlich findet, eine Änderung des Verlaufes der Erst- und der Zweitinfektion herbeiführen könne. Sie wurde zu diesem Zwecke bis zu völliger Klarheit zentrifugiert und so frisch, ohne jeden Sterilisationsversuch, verwendet. Die Resultate veranschaulicht die Tabelle II, S. 30 u. 31.

Die Versuche verliefen vollständig klar. Weder im Endergebnis, noch im Infektionsverlaufe trat unter dem Einflusse der Peritonealflüssigkeit überempfindlich gewordener Tiere eine wesentliche Änderung auf; auch das Ergebnis der Zweitinfektion war wie bei einem gewöhnlichen überempfindlichen Meerschweinchen. Es läfst sich somit, was je nach der Unfähigkeit der Hefe im Tiere zu wachsen von vornherein zu erwarten war, keine aggressive Wirkung des Exsudates nachweisen. Ebensowenig enthielt es etwa Antikörper, welche die Hefe besonders giftig machen könnten, noch auch Gifte selbst.

Von gröfstem Interesse sind die Versuche mit abgetöteter Hefe, Tabelle III, S. 32—34.

Durch Abtötung der Hefen mit Azeton geht somit die überempfindlich machende Wirkung derselben so vollständig verloren, dafs selbst eine viermalige Infektion der sonst sicher wirksamen Hefemenge weder den Tod noch irgendeine besondere Krankheit der Versuchstiere herbeizuführen vermag.

Es war noch von hohem Interesse zu ermitteln, wie sich Tiere verhalten, welche zum ersten Male mit lebenden, zum zweiten Male mit toten Blastomyzeten und umgekehrt geimpft werden.

Zu diesem Zwecke wurden einer Reihe von Meerschweinchen zum ersten Male je eine lebende Kultur + 2 ccm Na-LClösung

intraperitoneal injiziert; nach 6 Tagen wurden sie mit abgetöteten Blastomyzeten in der gleichen Menge geimpft. Eine zweite Reihe von Meerschweinchen erhielt in umgekehrter Reihenfolge eine Erstinjektion von abgetöteten, die Zweitinjektion nach 6 Tagen von lebenden Blastomyzeten.

Die Kapillarentnahmen unterblieben, um sekundäre Infektion und das durch die Entnahmen stattfindende Irritieren der Tiere zu vermeiden.

Keines von den geimpften Tieren zeigte auffallende Symptome einer Erkrankung, aufser einer kleinen Gewichtsabnahme, die am zweiten bis dritten Tage nach der Injektion festgestellt wurde und 10—20 g betrug. Vom vierten Tage an nahmen alle Tiere an Gewicht wieder zu. Von diesen, vielleicht wichtigsten Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen wird am Schlusse der Arbeit noch die Rede sein.

Vergleicht man die Tabellen, so wird ersichtlich, dafs die Leukozytose bei den zum ersten Male injizierten Tieren etwa 2 Stunden nach der Injektion beginnt. Nach dieser Zeit zeigen viele bis ziemlich alle Leukozyten Phagozytose. Bei den zweitinfizierten Tieren kommt die Leukozytose etwas früher zum Vorschein, jedenfalls deshalb, weil sich die Bauchhöhle noch von der ersten Injektion her im Reizzustande befindet. Ob die Blastomyzeten im lebendigen Zustande oder durch Azeton abgetötet benützt wurden, scheint keinen Einflufs auf die obenerwähnten Verhältnisse zu haben.

Die Leukozyten (Mikrophagen) scheinen jedoch eine geringe Rolle bei Vernichtung der Blastomyzeten zu spielen, da dieselben nach 24 Stunden im Exsudate wieder zu finden sind (nach der Erstinfektion), obwohl sie 6—8 Stunden nach der Injektion verschwunden sind. Aufserdem befinden sich die Blastomyzeten in den Makrophagen, ja hie und da sieht man Mikrophagen im Innern der Makrophagen (Kytophagozytose). Nach 48 Stunden etwa nehmen die Mikrophagen, die nach 24 Stunden noch zahlreich zu finden sind, ab, und man sieht viele Makrophagen,

Fortsetzung des Textes S. 34.

Tabelle II.

Nr.	Erst-infektion	Verlauf	Zweit-infektion nach 6 Tagen	Verlauf	Sektionsbefund und Bemerkungen
5. 205 g	Das flüssige Exsudat von Nr. 2 wurde zentrifugiert, die klare Flüssigkeit mit einer Kultur intraperitoneal injiziert.	Kein besonderer Unterschied gegenüber einem gewöhnlichen Erstinjizierten. Die Entnahmen zeigen ebenfalls keine Unterschiede, nur die Leukozytose kommt etwas später zustande und die Phagozytose ist bis nach 20 Stunden sichtbar.	1 Agarkultur + 2 ccm Na Cl-Lösung	Das Tier ist schw. krank, stirbt i. d. Nacht. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Rein. Blastomyzetenkult., ein. Leukozyt. Nach 1 Stunde: Blastom. massenhaft vorhanden. Leukozytose. Zweimal Phagozytose gefunden. Nach 2 Stunden: Die Zahl der Blastom. hat abgenommen. Leuko- und Phagozytose stark. Nach 3 Stunden: Ähnliches Bild, nur die Zahl der Blastomyzeten nimmt ab. Nach 4 Stunden: Desgl. Nach 5 Stunden: Freie Blastom. nicht mehr zu finden. Starke Leuko- und Phagozytose. Ovale, granulaähnliche Körperchen, vielleicht Blastomyzetenreste. Nach 6 Stunden: Reiner Eiter. Phagozytose nimmt ab. Keine Blastomyzeten. Nach 7 Stunden: Desgl. Nach 8 Stunden: Reiner Eiter. Phagozytose sehr selten zu finden, einzelne Mikrophagen sehen wie verwischt aus. Aus denselben scheinen die Blastomyzeten herauszuwachsen. Einzelne freie Blastomyzeten. Nach 9 Stunden: Polynukl. Leukozyt. massenh. vorhand. Keine Phagozytose. Hier u. da Blastom.	Im wesentlichen kein Unterschied von den vorigen. Nur in dem flüssig. Bauchhöhlenexsud. erscheinen mehr freie Blastomyz. vorzukommen. In den dicken Eitermassen am Omentum, Leber etc. befinden sich poly-, teilweise mononukleare Leukozyten, deren Plasma wie aufgequollen, zerflossen erscheint, und deren Kerne zu voluminösen Klumpen verändert sind. Aus der Peripherie derselb. erscheinen die Blastomyzeten herauszuwachsen. Freie Blastomyz. kommen zahlreich vor. Das Omentum ist mit dem Mesocolon ascendens verwachsen. Diese Verwachsung bildet ein erbsengrofses Knötchen, welches in der Mitte erweicht erscheint. Parenchym. Degeneration der Organe. Tumor lienis. Aus dem Exsudate, Milz und den Eitermassen wurden wieder reine Blastomyzeten gezüchtet. Das Blut steril.

7. 245 g	Bekommt eine 24 Stunden alte Kultur aufgeschwemmt in dem bis zur Klarheit zentrifugierten Bauchhöhlenexsudate von Nr. 5 intraperitoneal.	Das Tier ist schwer krank, bleibt jedoch am Leben. Kapillarentnahmen direkt nach der Injektion: Blastomyzeten massenhaft vorhanden. Leukozyten spärlich. Nach 1 Stunde: Zahlreiche Blastomyzeten. Leukozyten spärlich. Nach 2 Stunden: Desgl. Nach 3 Stunden: Noch immer eine ansehnliche Zahl von Blastomyzeten. Leukozyten reichlicher. Nach 4 Stunden: Blastomyzeten spärlicher. Leukozyten, Mikrophagen. Nach 5 Stunden: Desgl. Nach 6 Stunden: Leukozytose stark entwickelt, Phagozytose ebenfalls, keine Blastomyzeten. Nach 7 Stunden: Desgl. Nach 8 Stunden: Desgl.	1 Agarkultur + 2 ccm NaCl-Lösung	Das Tier ist schwer hinfällig, stirbt im Laufe der Nacht. Kapillarentnahme direkt nach der Injektion: Blastomyzeten, frei und in Klumpen. Nach 1 Stunde: Eine Anzahl von pulynukl. Leukozyten. Zahlreiche Blastomyzeten. Hier und da Phagozytose bemerkbar. Nach 2 Stunden: Blastomyzeten spärlich. Leuko- und Phagozytose stark. Nach 3 Stunden: Keine Blastomyzeten. Leukozyten sehr stark, zahlreiche Mikrophagen, einzelne Makrophagen. Nach 4 Stunden: Desgl. Nach 5 Stunden: Leukozytose sehr stark, einzelne Leukozyten zeigen Veränderungen wie bei Nr. 6. Blastomyzeten scheinen aus ihnen auszuwachsen. Einzelne freie Blastomyzeten wieder zu finden. Nach 7 Stunden: Reiner Eiter. Phagozytose kaum bemerkbar. Blastomyzeten vorhanden. Nach 8 Stunden: Desgl.	Sektionsbefund entspricht im wesentlichen dem von Nr. 6. Keine Verwachsung. zu finden. Die parenchym. Degeneration nicht so auffallend wie bei den früher sezierten Fällen. Milz nicht besonders vergrößert. Aus dem Exsudate der Bauchhöhle, den Eitermassen a. Leber, Omentum etc. wachsen reine Kulturen von Blastomyzeten. Das Blut steril.

Tabelle III.

Nr.	1. Infektion	Verlauf	2. Infektion nach 6 Tagen	Verlauf	3. Infektion nach 6 Tagen	Verlauf	4. Infektion nach 6 Tagen	Verlauf
4.	Eine mit Azeton behandelte Kultur + 2 ccm NaCl-lösung	Das Tier scheint nicht auffallend krank z. sein. Frifst nach 8 Std. und nach 24 Std. ist vollkommen munter.	Eine mit Azeton behandelte Kultur + 2 ccm NaCl-lösung	Das Tier lebt ohne auffällig krank zu sein.	Eine mit Aceton behandelte Kultur + 2 ccm NaCl-lösung	Das Tier ist vollkommen munter und frifst.	Eine mit Azeton behandelte Kultur + 2 ccm NaCl-lösung	Das Tier ist vollkommen munter und frifst.
		Kapillarentnahmen direkt n. d. Injektion: Zahlreiche Blastomyz., die frei u. in Häufchen liegen.		Kapillarentnahmen direkt n. d. Injektion: Blastomyz. massenhaft vorhanden. Einzelne Leukozyten.		Kapillarentnahmen direkt n. d. Injektion: Massenhafte Blastomyzeten.		Kapillarentnahmen direkt n. d. Injektion: Blastomyz. massenhaft vorhanden.
		Nach 1 Stunde: Massenh. Blastom. Hier u. da ein Leukozyt.		Nach 1 Stunde: Sehr viele Blastomyz. Leukozytose mäfsig. Phagozytose spärlich.		Nach 1 Stunde: Die Zahl der Blastom. unverändert. Leukozytose schwach.		Nach 1 Stunde: Zahlr. Blastomyz. Polynukleäre Leukozyten ziemlich reichlich vorhanden. Einzelne Makrozyten.
		Nach 2 Stunden: Leukozyt. zahlreicher, viele von ihnen zeigen Phagozytose. Blastom. noch immer zahlreich.		Nach 2 Stunden: Blastom. noch leicht zu finden. Starke Leuko- und Phagozytose.		Nach 2 Stunden: Blastomyzet. stark verschwunden. Leukozyt. Hier u. da Phagozyten.		Nach 2 Stunden: Leuko- u. Phagozytose bereits entwickelt. Blastomyzeten einzeln zu finden.

Nach 3 Stunden: Leukozyten zahlr. vorhanden, mehr als die Hälfte v. ihnen zeigen Phagozytose. Blastom. noch zieml. zahlreich.	**Nach 3 Stunden:** Die Zahl der Blastom. geringer. Leuko- und Phagozytose reichlich.	**Nach 3 Stunden:** Leuko- u. Phagozytose stark, keine freien Blastomyzeten.	**Nach 3 Stunden:** Starke Leuko- u. Phagozytose. Blastomyzeten nicht mehr zu finden.
Nach 4 Stunden: Leuko- u. Phagozytose nimmt stark zu. Einzel. Blastom. noch sichtbar.	**Nach 4 Stunden:** Desgl.	**Nach 4 Stunden:** Desgl.	**Nach 4 Stunden:** Das Bild im wesentlichen unverändert.
Nach 5 Stunden: Starke Leuko- u. Phagozytose. Freie Blastom. nicht mehr zu finden.	**Nach 5 Stunden:** Noch zwei freie Blastomyzetenzellen gefunden. Leuko- u. Phagozytose reichlich.	**Nach 5 Stunden:** Desgl.	**Nach 5 Stunden:** Reiner Eiter. Keine Blastomyzeten.
Nach 6 Stunden: Leukozytose wie oben, Phagozytos. schwächer.	**Nach 6 Stunden:** Leukozyt. unverändert. Phagozytose nimmt ab.	**Nach 6 Stunden:** Desgl.	**Nach 6 Stunden:** Desgl.
	Nach 7 Stunden: Desgl.	**Nach 7 Stunden:** Reiner Eiter, Phagozytose nimmt ab.	**Nach 7 Stunden:** Desgl.
	Nach 8 Stunden: Desgl.	**Nach 8 Stunden:** Desgl.	**Nach 8 Stunden:** Reiner Eiter. Phagozytose kaum bemerkbar. Blastomyz. nicht zu finden.
	Nach 9 Stunden: Reiner Eiter. Phagozytose sehr spärlich		

Fortsetzung der Tabelle III.

Nr.	1. Infektion	Verlauf	2. Infektion nach 6 Tagen	Verlauf
8.	Wie 4.	Das Tier frifst und ist vollkommen munter. Kapillarentnahmen direkt n. d. Injektion: Freie Blastomyzeten. Nach 1 Stunde: Blastom. massenh. vorhanden, einzelne polynukleäre Leukozyten. Nach 2 Stunden: Die Zahl der Leukozyten hat zugenommen, einzelne Phagozyten. Zahlr. Blastomyzeten. Nach 3 Stunden: Leuko- und Phagozytose bereits stark. Blastomyzeten noch immer leicht zu finden. Nach 5 Stunden: Starke Leuko- u. Phagozytose. Keine Blastom. zu sehen. Nach 6 Stunden: Leukozytose stark, Phagozyt scheint langsam abzunehmen. Keine Blastom. zu finden. Nach 7 Stunden: Reiner Eiter. Phagozytose schwächer wie vorher. Keine Blastomyzeten. Nach 8 Stunden: Desgl.	Wie 4.	Das Tier ist vollkommen munter u. frifst. Kapillarentnahmen direkt n. d. Injektion: Reine Blastomyzeten, auch in Klumpen. Nach 1 Stunde: Grofse Zahl von Blastomyz. Leukozyten vereinzelt. Nach 2 Stunden: Starke Leukozytose, Phagozytose hier u. da bemerkbar. Die Zahl der Blastomyzeten hat abgenommen. Nach 3 Stunden: Starke Leuko- und Phagozytose. Blastomyzeten kaum bemerkbar. Nach 4 Stunden: Sehr starke Leuko- u. Phagozytose. Keine Blastomyz. Nach 5 Stunden: Desgl. Nach 6 Stunden: Reiner Eiter. Phagozytose nimmt ab. Keine Blastomyzeten. Nach 7 Stunden: Desgl.

welche zum Teil in den Verdauungsvakuolen verschrumpfte Blastomyzeten enthalten. Drei Tage nach der Injektion findet man zahlreiche Makrophagen, die grobe Granula, wahrscheinlich von Blastomyzeten herrührend enthalten, aufserdem finden sich noch Makrophagen, die verschrumpfte Blastomyzeten in Verdauungs-

vakuolen zeigen. Daneben findet man poly- und mononukleäre Leukozyten von gewöhnlichem Aussehen.

Bei der zweiten Injektion kann man nach 7—8 Stunden zerfallene wie verwischte Mikrophagen, aus denen Blastomyzeten herausfallen, neben freien Blastomyzeten, die wieder zum Vorschein kommen, wahrnehmen.

Obwohl es nicht ganz leicht ist, aus den Einzelbildern, die man bei den Kapillaren-Entnahmen erhält, den ganzen Infektionsverlauf mit Sicherheit zu rekonstruieren, und obwohl es oft mifslich ist, aus blofsem mikroskopischem Befunde Lebensfähigkeit oder Tod der gefundenen Mikroben zu bestimmen, so scheinen doch vorwiegend nur die Makrophagen eine ausgesprochene Fähigkeit zur Zerstörung von Hefen zu besitzen. Die polynukleären Leukozyten zeigen zwar starke, oft stärkste Phagozytose, deren Zweck aber nicht so sehr die direkte Abtötung der Hefe zu sein scheint, als vielmehr ihre Entfernung aus der Bauchhöhle und ihre Ablagerung hauptsächlich am Grofsnetze. In den Eitermassen, die sich dort finden, stellen sich sehr bald Makrophagen und polynukleäre Leukozyten von bedeutender Gröfse ein, denen möglicherweise erst die eigentliche Abtötung der Hefe zufallen könnte. Manche Bilder lassen sich kaum anders deuten. Inwiefern der eben erwähnte Befund des Zerfalls polynukleären Phagozyten, der hauptsächlich bei der zweiten Infektion zu beobachten ist, mit der Überempfindlichkeit zusammenhängen könnte, wage ich nicht zu erörten. Jedenfalls sei darauf aufmerksam gemacht, da jeder derartige Befund ausdrücklich einen Anhaltspunkt zur Erklärung des geänderten Verhaltens des allergischen Organismus abgeben könnte.

Trifft es zu, dafs vorwiegend Makrophagen und ihnen entsprechende Zellen die definitive Abtötung der Hefen besorgen, so wäre eine Parallele gefunden mit der Entdeckung Metschnikoffs, die wichtige Rolle der Makrophagen bei Tuberkulose betrifft und die analoge Beobachtung Nakayamas bei Aktinomykose.

Schattenfroh ([17]) hat gefunden, dafs weder Blut noch Serum auf die Keimfähigkeit der Hefe einen Einflufs hat, dafs jedoch die gewöhnliche Bierhefe im Tierkörper rasch zugrunde geht, und zwar durch Phagozytose, die er als eine intrazelluläre

Alexinwirkung erklärt. Bei pathogenen Mikroorganismen, z. B. bei Soor, hat der erwähnte Autor gefunden, dafs nur ein frisches Exsudat auf dieselben tödlich einzuwirken imstande ist, obwohl nach Einwirkung von frischem Exsudate auf Soor binnen 24 Stunden noch 65 bis 110 Kolonien auf den Platten gewachsen sind.

Aufserdem kommen ziemlich bei jeder Entnahme in den ersten Stunden nach der Injektion desquammierte Epithelien und Lymphozyten vor.

Die Blastomyzeten, die in den Entnahmen in späteren Stunden oder bei den zweitinfizierten bei der Sektion frei gefunden werden, unterscheiden sich nicht von der kulturell gezüchteten, weder mikroskopisch noch makroskopisch (in Kulturen).

Einige Versuche wurden angestellt, um zu sehen, ob die verwendete Hefe auch bei anderen Tieren, bei Kaninchen, Überempfindlichkeit hervorrufen könne. Eine direkte Pathogenität kommt der genannten Torulaart für Kaninchen nicht zu, da sie bei intraperitonealen wie bei intravenöser Injektion relativ sehr grofse Mengen ohne ersichtlichen Schaden für das Tier vertragen wurde. Leider ist die intravenöse Hefeinjektion an sich für Kaninchen sehr gefährlich, da Klumpenbildung bei Herstellung der Aufschwemmungen kaum zu vermeiden ist und bei Filtration der Suspensionen durch Papier oder Watte ein sehr grofser Teil der Hefen zurückgehalten wird. Eine ganze Anzahl von Kaninchen starb kurze Zeit nach der Injektion an Enbolien. Verwendbar erwiesen sich mit einigen Ausnahmen nur gröfsere Kaninchen, bei denen man eine Kultur in mehreren Kubikzentimetern NaCl-Lösung aufgeschwemmt ohne Nachteil injizieren konnte. Diese Kaninchen vertrugen eine Kultur, ohne Symptome einer Erkrankung zu zeigen: die Temperatur stieg nicht, die Tiere waren vollkommen munter, frafsen und nahmen an Gewicht zu. Wurden dieselben in etlichen Tagen getötet, so liefsen sich weder pathologische Veränderungen noch Blastomyzeten in irgendwelchen Organen auffinden.

Injiziert man jedoch den Kaninchen Blastomyzeten intraperitoneal, so werden die Tiere typisch überempfindlich.

Ein Kaninchen (490 g) erhält $^3/_4$ von einer Blastomyzetenagarkultur intraperitoneal. Lebt, nach 6 Tagen erhält es wieder $^3/_4$ von einer Blastomyzetenagarkultur intraperitoneal. Am nächsten Tage nimmt es um 30 g ab und stirbt nach 36 Stunden.

Ein Kaninchen (708 g) erhält eine Blastomyzetenagarkultur intraperitoneal, nimmt am nächsten Tage 12 g, am zweiten 10 g ab, dann nimmt es wieder an Gewicht zu. Nach 6 Tagen wiegt es 780 g und erhält wieder eine Blastomyzetenagarkultur intraperitoneal. Stirbt nach schwerer Erkrankung 18 Stunden nach der Zweitinjektion.

Ein Kaninchen (575 g) bekommt $^1/_4$ von einer Blastomyzetenagarkultur + 1 ccm NaCl-Lösung intravenös, lebt, nimmt am nächsten Tage an Gewicht zu. Nach 6 Tagen wiegt es 680 g, bekommt eine Blastomyzetenagarkultur intraperitoneal und nimmt am nächsten Tage 30 g ab. Lebt, nach 6 Tagen erliegt es einer neuerlichen Injektion einer Kultur in 36 Stunden.

Die Versuche zeigten, dafs auch Kaninchen sich bei wiederholten Injektionen, ähnlich wie Meerschweinchen, überempfindlich erwiesen.

Dafs die Erscheinungen meist nicht ganz so stürmisch sind wie bei Meerschweinchen, kann nicht überraschen. Jedenfalls besteht im Prinzip Übereinstimmung zwischen der Wirkung der Hefe auf beide Tierarten.

Der Sektionsbefund unterscheidet sich im wesentlichen nicht von dem bei den Meerschweinchen, nur die Verwachsungen der Baucheingeweide untereinander und mit der Bauchwand wurden nicht gefunden. Aus dem Exsudate und aus den Auflagerungen des Eiters an der Leber, Milz etc., sowie aus der Milz selbst wurden reine Kulturen gezüchtet, das Blut war steril. Parenchymatöse Degeneration der Leber und Niere leichten Grades und Milztumor waren vorhanden, während in anderen Organen pathologische Veränderungen fehlten.

Auffallend ist, dafs die intravenöse Injektion von Hefe eine deutliche Überempfindlichkeit gegen eine nachträgliche intraperitoneale nicht hervorgerufen hat. Es ist sehr zu bedauern, dafs der weiteren Ausführung ähnlicher Untersuchungen so grofse

technische Schwierigkeiten entgegenstehen, dafs sie erst durch Verwendung eines grofsen Tiermateriales, das zur Zeit meiner Versuche nicht zur Verfügung stand, überwunden werden können. Weitere Untersuchungen müssen über diesen Punkt Klarheit schaffen. Denn es scheint tatsächlich, als ob der typische Befund der Überempfindlichkeit nur bei einer bestimmten Infektionsweise auftrete. So konnte Nakayama durch subkutane Erstinfektion mit Aktinomyzes keine Überempfindlichkeit gegen eine folgende intraperitoneale erzeugen und umgekehrt. Es ist dabei natürlich sofort zuzugeben, dafs subkutane und intraperitoneale Injektion durchaus ungleichwertig sind. Bei ersterer sind die Resorptionsbedingungen des Antigens sehr ungünstig, dafür aber die Möglichkeit der raschen Elimination des Antigens durch Eiterung und Abszefsbildung sehr günstig. Am ehesten liefse sich noch intravenöse und intraperitoneale Impfung kombinieren. Für Aktinomyzes war aber bei der Beschaffenheit der Kulturen an eine intravenöse Injektion überhaupt nicht zu denken, bei Hefe mufste ich die traurigsten Erfahrungen über die Gefahr dieser Infektionsweise machen. Die Frage nach der Gleichwertigkeit der Beibringung des Antigens in bezug auf die Ausbildung der Überempfindlichkeit mufs also vorläufig noch offen bleiben. Hängt diese, wie es bisher den Anschein hat, tatsächlich davon ab, dafs die aufeinanderfolgenden Injektionen immer intraperitoneal gemacht werden müssen, so würde das sehr zugunsten einer Lähmung von Schutzkräften, die diesmal mehr lokaler Natur wären, sprechen, während es mit der Annahme einer wesentlichen Beteiligung von Antikörpern irgendwelcher Art im Widerspruch stände. Natürlich würde sich das nur auf die Überempfindlichkeit gegen geformte Antigene beziehen, da für die gegen gelöste andere Verhältnisse anzunehmen sind.

Zu weiteren Experimenten wurden Kulturen der Hefe »Logos« verwendet, welche Art, als eine wohlbekannte, näherer Beschreibung nicht bedarf. Sie wurde einerseits wegen ihrer leichten Erkenntlichkeit gewählt, anderseits deshalb, weil es erwünscht erschien, an zwei möglichst voneinander abweichenden Blastomyzeten festzustellen, ob das bei der Torula gefundene

Verhalten im Tierkörper den Blastomyzeten überhaupt zukommt. Als ein Vertreter der Schizosaccharomyzeten ist die Logoshefe im System weit genug von Torula getrennt. Tatsächlich zeigte sich im Prinzip Übereinstimmung, im Detail mannigfache Abweichung des Verlaufes der Erst- und Mehrinfektionen. Es dürfte sich daraus wohl der Schlufs ableiten lassen, dafs die Fähigkeit Überempfindlichkeit hervorzurufen, den Blastomyzeten allgemein zukommt, allerdings in verschieden hohem Grade für die einzelnen Hefearten.

Es wurden ausschliefslich Bierwürzekulturen verwendet, die nach abgegossener Bierwürze zweimal gewaschen und dann in einer Aufschwemmung von 2 ccm NaCl-Lösung im lebendigen Zustande oder durch Azeton abgetötet und mit derselben Menge von NaCl-Lösung aufgeschwemmt intraperitoneal injiziert wurden. Die Experimente wurden mit demselben Resultate wiederholt.

Wie die Tabellen, S. 40—43, zeigen, unterscheiden sich die Experimente von den vorangegangenen im wesentlichen nur dadurch, dafs die Tiere erst nach der dritten Injektion zugrunde gegangen sind. Weiter kann auffallen, dafs die Blastomyzeten viel früher verschwunden sind, als es bei den früheren Experimenten der Fall war. Die Erklärung dafür möchte ich aus den morphologischen Unterschieden beider Hefearten herleiten. Die Logoshefe ist einmal viel gröfser als die früher erwähnte und überdies sind die Zellen zu dicken Klumpen vereinigt, welche durch Schütteln schwer zu trennen sind, was leicht an einer Bierwürzekultur makroskopisch zu sehen ist. Dieser Zustand wird durch Azeton noch verstärkt. Vermutlich deshalb setzen sich dieselben bald nach der Injektion und zwar vorzugsweise am grofsen Netz an, wo man bei der Sektion die Blastomyzeten in Klumpen, umgeben von zahlreichen polynukleären Leukozyten vorfinden kann. Dieser eigentümliche Zustand kann auch als Grund für die bald schwindende Phagozytose ansehen werden. Die Leukozyten phagozytieren nämlich nur durch Schütteln oder andere Einflüsse freigemachte Zellen. Man findet dann gewöhnlich nur eine Zelle in einem Mikrophage.

Meerschweinchen Nr. 21 — 290 g.

Beobachtungszeit	Erste Infektion 1 Kultur + 2 ccm Na Cl-Lösung	Zweite Infektion nach 7 Tagen 1 Kultur + 2 ccm Na Cl-Lösung	Dritte Infektion nach 7 Tagen 1 Kultur + 2 ccm Na Cl-Lösung	Sektionsbefund
Direkt	Massenhafte Blastomyzeten.	Blastomyzeten einzeln und in Häufchen, hier u. da Leukoz.	Massenhafte Blastomyzet. Mäßsige Anzahl v. Leukoz.	In der Bauchhöhle etwa 8 ccm gelbliches, flockenreiches Exsudat. Dasselbe zeigt einzelne polynukl. Leukozyten u. vereinzelte kleine Lymphozyten. An der Leber, Milz, Darmschlingen und der Bauchwand befinden sich dicke Eitermassen, die aus polynukleären Leukozyten, zerfallenen Mikrophagen und einzelnen Makrophagen bestehen. In denselben befinden sich freie Blastomyzeten. Sehr starke Adhäsionen am Grofsnetz und zahlreiche Verwachsungen der Baucheingeweide untereinander und mit der Bauchwand. Degener. parenchym. organorum. Tumor lienis. Aus den Eitermassen, aus dem Exsudate u. aus der Milz wurden reine Kulturen von Blastomyz. gezüchtet. Das Blut steril.
1 Std.	Einzel. Leukozyten, Lymphozyten sehr spärlich. Massenhafte Blastomyzeten.	Eine gröfsere Anzahl v. Leukozyten. Viele davon zeigen Phagozytose. Blastomyzeten etwas abgenommen.	Leukozyten haben stark zugenommen. Viele L. zeigen Phagozytose. Spärliche Blastomyzeten.	
2 Stdn.	Leukozyten haben etwas zugenommen. Einzelne Phagozytose zu sehen. Blastomyzet. nehmen ab.	Leukozytose u. Phagozytose bereits entwickelt. Spärliche Blastomyzeten.	Leukozytose u. Phagozyt. bereits entwickelt. Blastomyzet. einzeln zu finden.	
3 »	Starke Leukozytose, fast alle L. zeigen Phagozytose. Blastomyzeten sehr spärlich.	Sehr starke Leukozytose, ein Viertel der Zellen zeigt Phagozytose. Blastomyzeten kaum zu finden.	Leuko- und Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	
5 »	Leukozytose sehr stark, die Hälfte der Zellen zeigt Phagozytose, keine freien Blastom,	Reiner Eiter. Weder Phagozytose noch Blastomyzeten.	Leukozytose, Phagozytose kaum zu finden. Keine Blastomyzeten.	
6 »	Desgl.	Desgl.	Reiner Eiter.	
7 »	Leukozytose sehr stark, Phagozytose nimmt bedeutend ab. Keine Blastomyzeten.	Desgl.	Desgl.	
8 »	Reiner Eiter. Keine Phagozytose, keine Blastomyzeten.	Desgl.	Desgl.	
	Das Tier bleibt am Leben ohne auffallend krank z. sein.	Das Tier h. Symptome schwer. Periton. gezeigt, überlebt aber.	Das Tier stirbt nach 12 Stunden.	

Meerschweinchen Nr. 22 — 287 g.

Beobachtungszeit	Erste Injektion mit einer durch Azeton abgetöteten Kultur + 2 ccm NaCl-Lösung	Zweite Injektion nach 7 Tagen mit einer durch Azeton abgetöteten Kultur + 2 ccm NaCl-Lösung	Dritte Injektion nach 7 Tagen mit einer durch Azeton abgetöteten Kultur + 2 ccm NaCl-Lösung	Vierte Injektion nach 7 Tagen mit einer durch Azeton abgetöteten Kultur + 2 ccm NaCl-Lösung	Sektionsbefund
Direkt	Massenhafte Blastomyzet., vorzugsweise in Klumpen.	Wie bei der Erstinfektion.	Befund wie nach der 1. und 2. Injektion.	Blastomyzet. in Klumpen und vereinzelt. Spärliche Leukozyten.	
1 Std.	Sehr spärliche Leukozyten. Massenhafte Blastom. wie vorher	Größere Anzahl von Leukozyten. Einzelne L. zeig. Phagozytose. Blastomyzet. in Klumpen vorhanden.	Leukozytose bereits entwickelt. Zahlr. L. zeigen Phagozytose. Einzel. Blastomyzeten.	Leukozyten stark zugenommen, viele von ihnen zeigen Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	
2 »	Leukozyten nehmen zu. Fast alle zeigen Phagozytose. Einzelne Klumpen von Blastomyzeten.	Starke Leukozytose. Ein Viertel davon zeigt Phagozytose. Keine Blastomyzet.	Leukozytose, etw. ein Viertel davon zeigt Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	Leukozytose bereits stark entwickelt, zahlreiche Phagozyten. Keine Blastomyzeten.	Das Tier blieb am Leben u. nimmt zu.
3 »	Leukoz. stark entwickelt, zahlreiche L. zeigen Phagozytose. Blastomyz. nicht zu finden.	Leuko- und Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	Leukozytose sehr stark. Phagozytose nimmt ab. Keine Blastomyzeten.	Reiner Eiter. Phagozytose sehr stark abgenommen. Keine Blastomyzeten.	
5 »	Leuko- und Phagozytose, keine Blastomyzeten.	Reiner Eiter. Keine Phagozytose. Keine Blastomyzet.	Reiner Eiter. Zweimal Phagozytose gefunden. Keine Blastomyzeten.	Reiner Eiter. Keine Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	
6 »	Reiner Eiter. Keine Phagozytose. Keine Blastomyz.	Reiner Eiter. Keine Blastomyzeten.	Reiner Eiter. Keine Blastomyzeten.	Desgl.	
7 »	Desgl.	Desgl.	Desgl.	Desgl.	
8 »	Desgl.	Desgl.	Desgl.	Desgl.	
	Das Tier ist vollkommen munter und frißt.	Das Tier ist munter und bleibt am Leben.	Das Tier vollkommen munter.	Das Tier ist vollkommen munter.	

Meerschweinchen Nr. 23. — 260 g.

Beobachtungszeit	Erste Injektion 1 Kultur + 2 ccm Na Cl-Lösung	Zweite Injektion nach 7 Tagen 1 Kultur + 2 ccm Na Cl-Lösung	Dritte Injektion nach 7 Tagen 1 Kultur + 2 ccm Na Cl-Lösung	Sektionsbefund
Direkt	Massenhafte Blastomyzeten vereinzelt und in Klumpen. Keine Leukozyten.	Zahlreiche Blastom. einzeln und in Klumpen. Einzelne Leukozyten.	Blastomyzet. in Klumpen. Spärliche Leukozyten.	In der Bauchhöhle etwa 10 ccm gelbliches Exsudat, in dem sich einzelne polynukleäre Leukozyten befinden. An der Leber u. an anderen Eingeweiden dicke Eitermassen, die vorzugsweise aus polynukl. Leukozyten und freien Blastomyzeten bestehen. Einzelne Makrophag. vorhanden. Starke fibröse Adhäsionen zwisch. Omentum, Baucheingeweiden u. Bauchwand. Degeneratio parenchymatosa organorum. Tumor lienis. Aus dem Exsudate, Milz und Eitermassen wurden reine Kulturen von Blastomyzeten gezüchtet. Das Blut steril.
1 Std.	Einzelne Leukozyten. Zahl der Blastomyzeten kaum verändert.	Blastom. wie vorher. Etliche Leukozyten, viele davon zeig. Phagozytose.	Eine Anzahl von Leukozyten, fast alle zeig. Phagozytose. Die Zahl der Blastomyz. stark abgenommen.	
2 Stdn.	Die Leukozyt. sind zahlreicher. Fast die Hälfte zeigt Phagozyt. Die Zahl der Blastomyzeten kaum bemerkbar verändert.	Leukozytose, Phagozytose, einzelne Blastomyzeten zu zu finden.	Starke Leukozytose, die Phagozytose nimmt ab. Keine Blastom. zu finden.	
3 »	Starke Leukozytose, $^3/_4$ davon zeigen Phagozytose. Blastom. spärlich vorhanden.	Leukozytose u. Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	—	
4 »	Leukozytose stark, Phagozyt. scheint etwas abgenommen zu haben. Blastom. sehr spärlich.	Leukozytose sehr stark. Phagozytose vereinzelt. Keine Blastomyzeten.	Leukozytose sehr stark, einzelne Phagozyt. Keine Blastomyzeten.	
5 »	Leukozytose w. vorher, Phagozytose abgenommen. Keine Blastomyzeten.	Starke Leukozytose, Phagozytose sehr spärlich. Keine Blastomyzeten.	Leukozytose nimmt noch immer zu, Phagozytose nur einmal gefunden, keine Blastomyzeten.	
6 »	Desgl.	Desgl.	Rein. Eiter. Keine Blastom.	
7 »	Rein. Eiter. Weder Leuko- noch Phagozyt. Blastom. n. z. finden.	Reiner Eiter. Keine Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	Desgl.	
8 »	Desgl.	Desgl.	Desgl.	
	Das Tier lebt.	Das Tier schwer hinfällig und bleibt trotzdem am Leben.	Das Tier stirbt in der Nacht.	

Meerschweinchen Nr. 24. — 210 g.

Beobachtungszeit	Erste Injektion mit durch Azeton abgetöteter Kultur + 2 ccm NaCl-Lösung	Zweite Injektion mit durch Azeton abgetöteter Kultur + 2 ccm NaCl-Lösung	Dritte Injektion mit durch Azeton abgetöteter Kultur + 2 ccm NaCl-Lösung	Sektionsbefund
Direkt	Massenhafte Blastomyzeten in Klumpen.	Zahlreiche Blastomyzeten in Klumpen und vereinzelt.	Massenhafte Blastomyzeten, vorzugsweise in Klumpen.	—
1 Stunde	Einzelne Leukozyten. Blastomyzeten wie vorher.	Die Zahl der Leukozyten sehr klein. Sonst wie vorher.	Mäfsige Anzahl von Leukozyten. Ziemlich alle zeigen Phagozytose. Die Zahl der Blastomyzeten scheint abgenommen zu haben.	
2 Stunden	Die Zahl der Leukozyten hat etwas zugenommen. Fast alle zeigen Phagozytose. Einzelne Blastomyzeten.	Leukozytose nimmt zu. Phagozytose zu finden. Keine Blastomyzeten.	Starke Leukozytose, etwa $^1/_3$ davon zeigt Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	
3 »	Leukozytose stark entwickelt. Phagozytose nimmt ab. Keine Blastomyzeten.	Leukozytose, Phagozytose. Keine Blastomyzeten.	Leukozytose sehr stark. Phagozytose kaum zu finden. Keine Blastomyzeten.	
4 »	Leukozytose stark, Phagozytose hier u. da zu finden. Kein. Blastom.	Desgl.	Desgl.	
5 »	Leukozytose sehr stark. Weder Phagozytose noch Blastomyzeten.	Reiner Eiter. Keine Blastomyzeten.	Reiner Eiter. Keine Blastomyzeten.	
6 »	Reiner Eiter. Keine Blastomyz.	Desgl.	Desgl.	
7 »	Desgl.	Desgl.	Desgl.	
8 »	Desgl.	Desgl.	Desgl.	
	Das Tier zeigt keine Krankheitssymptome.	Das Tier vollkommen munter.	Das Tier bleibt am Leben.	

Der Sektionsbefund unterscheidet sich von dem bei den früher erwähnten Tieren gar nicht.

Weiterhin schien es erforderlich, festzustellen, wie lange der eigenartige Körperzustand, welcher die Überempfindlichkeit bedingt, anhält; im Zusammenhange damit wurde auch die kleinste Menge von Blastomyzeten zu bestimmen gesucht, welche zu einer Herbeiführung noch ausreicht. Zu diesem Versuche wurde nur die Torulahefe verwendet. Die Versuchsanordnung ist aus der Tabelle ersichtlich.

Versuchstier	Erstinjektion	Intervall zwischen der 1. und 2. Injektion	Zweitinjektion	Intervall zwisch. der 2. u. 3. Injektion	Drittinjektion	Ausgang
Meerschw. Nr. 34	$\frac{1}{4}$ Kultur + $\frac{1}{2}$ ccm Na Cl-Lösung	6 Tage	$\frac{1}{4}$ Kultur + $\frac{1}{2}$ ccm Na Cl-Lösung			Lebt.
Nr. 36.	$\frac{1}{2}$ Kultur + 1 ccm Na Cl-Lösung	6 Tage	Desgl.			Lebt.
Nr. 40.	$\frac{1}{2}$ Kultur + 1 ccm Na Cl-Lösung	6 Tage	$\frac{1}{2}$ Kultur + 1 ccm Na Cl-Lösung			Lebt.
Nr. 42.	$\frac{1}{2}$ Kultur + 1 ccm Na Cl-Lösung	6 Tage	$\frac{3}{4}$ Kultur + $1\frac{1}{2}$ ccm Na Cl-Lösung			Schwerkrnk., lebt.
Nr. 43.	$\frac{3}{4}$ Kultur + $1\frac{1}{2}$ ccm Na Cl-Lösung	6 Tage	$\frac{3}{4}$ Kultur + $1\frac{1}{2}$ ccm Na Cl-Lösung			Stirbt nach 16 Stdn.
Nr. 44.	2 Kulturen + 4 ccm Na Cl-Lösung	6 Tage	$\frac{1}{4}$ Kultur + $\frac{1}{2}$ ccm Na Cl-Lösung			Lebt.
Nr. 38.	1 Kultur + 2 ccm Na Cl-Lösung	8 Tage	1 Kultur + 2 ccm Na Cl-Lösung			Stirbt in der Nacht.
Nr. 39.	Desgl.	10 Tage	Desgl.			Stirbt nach 20 Stdn.
Nr. 45.	Desgl.	14 Tage	Desgl.			Stirbt nach 36 Stdn.
Nr. 46.	Desgl.	21 Tage	Desgl.			Schwerkrnk., lebt.
Nr. 48.	Desgl.	30 Tage	Desgl.			Lebt.

Um Tiere überempfindlich zu machen, ist somit mindestens die Hefenmenge von 3/4—1 Agarkultur bei intraperitonealer Einspritzung erforderlich, wenn die Zweitinfektion mit der gleichen Menge vorgenommen wird. Festzustellen, welche kleinste Hefenmenge bei schon ausgebildeter Überempfindlichkeit genügt, um schwere Krankheit und Tod herbeizuführen, war wegen Tiermangels noch nicht möglich.

Es erschien auch wichtiger, die Dauer des allergischen Zustandes der Versuchstiere zu ermitteln, wobei sich mit Sicherheit feststellen liefs, dafs er sich nicht über den Zeitraum von 3 bis 4 Wochen hinauserstreckt und schon nach ca. 2 Wochen nicht mehr so deutlich wie nach einer Woche ausgebildet ist. Das stimmt fast auf den Tag mit der Überempfindlichkeit überein, die Nakayama bei seinem Versuch mit Aktinomyzes erzeugen konnte.

Wie bereits früher erwähnt wurde, soll und kann der Versuch nicht gemacht werden, aus dem Berichte über die Ergebnisse der Überempfindlichkeitsstudien mit Hefen, Schlüsse allgemeiner Natur über Phänomen der Überempfindlichkeit überhaupt zu geben. Denn ganz offenkundig stimmt die allergische Reaktion des Meerschweinchenorganismus gegen Hefe und gegen Aktinomyzes (Nakayama) nur in den allgemeinsten Zügen mit der des menschlichen Organismus gegen fremdes Serum (von Pirguet und Schick) überein. Dafs beiden ein gemeinsamer Typus zugrunde liegen und eine gemeinsame Erklärung für beide gefunden werden mufs, wird nicht bezweifelt werden können, vorläufig ist die Verschiedenheit der Details noch zu grofs, um die Übereinstimmung des Prinzips klar hervortreten zu lassen.

Auf gewisse Punkte mufs aber trotz dieser notwendigen Selbstbeschränkung etwas näher eingegangen werden.

Zunächst könnte eingewendet werden, dafs die Tiere nach der ersten Injektion im allgemeinen körperlich so herabgekommen wären, dafs sie eine zweite Erkrankung nicht mehr überstehen könnten.

Diesen Einwurf hat schon Nakayama in Betracht gezogen: »Tatsächlich ist die Ernährung der Tiere im Stadium, in welchem

die Überempfindlichkeit am stärksten hervortritt, bedeutend mehr als in den späteren Stadien gestört, wo sie weit schwächer in Erscheinung tritt.«

Er hat auch bereits darauf hingewiesen, »dafs die Überempfindlichkeit, wenn sie nur auf einer allgemeinen Unterernährung beruhen würde, auch dann hervortreten müfste, wenn die Tiere einer anderen Schädigung, z. B. der Einspritzung von Tuberkelbazillen, ausgesetzt werden, was aber nicht der Fall ist.«

Wie aus nachstehender Tabelle (S. 141) ersichtlich ist, kann für Hefeversuche der Einwand einer durch die Erstinjektion gesetzter Krankheit, die sich in Ernährungsstörungen äufsern müfste, überhaupt nicht vorgebracht werden, da die Tiere am zweiten bzw. dritten Tage nach der ersten Injektion zwar etwas an Gewicht abnehmen, von diesem Zeitpunkte aber an Gewicht beständig gewinnen und dies bei vollster Überempfindlichkeit. Dies wurde bei Meerschweinchen wie bei Kaninchen beobachtet.

Krankheit nach der ersten Injektion der Hefe zeigte sich oft gar nicht und besonders wenn Kapillarentnahmen vermieden wurden. Einige Tiere waren sogar etwa 8 Stunden nach der ersten Injektion vollkommen munter, haben lustig an in den Käfig geworfenen Kohlrübenblättern genagt, ohne die kleinsten Symptome einer Erkrankung zu zeigen.

Die Überempfindlichkeit gegen Hefe schliefst sich, wofür auch andere Erscheinungen sprechen, der gegen Aktinomyzes und gegen Tuberkulose an, und diese drei bilden offenbar eine besondere Gruppe, innerhalb deren sie eine gewisse Abstufung des Überempfindlichkeitsphänomens vertreten. Bei Tuberkulose handelt es sich um Tiere, welche durch aktive Ansiedelung des Antigens unheilbar krank geworden sind, bei Aktinomyzes vermag das Antigen sich noch eine Zeitlang im Tiere zu halten und eine Krankheit, allerdings nur lokaler Natur, hervorzurufen, bei Hefen, die hier verwendet wurden, fehlt jeder tiefgehende spezifische Einflufs auf den Organismus: und dennoch tritt überall die Überempfindlichkeit mit ihren verderblichen Folgen, wenn auch nicht in ganz gleicher, so doch in vergleichbarer Weise auf.

Tabelle über das Körpergewicht der Versuchstiere.

Versuchstiere	Körpergewicht vor der ersten Injektion	Körpergewicht nach der Injektion in Gramm				
		24 Stdn.	48 Stdn.	3 Tage	4 Tage	5 Tage
	g					
Meerschweinchen Nr. 15 . .	200	195	205	nimmt zu		
» Nr. 18 . .	210	208	225	»	»	
» Nr. 25 . .	250	215	220	225	238	
» Nr. 32 . .	230	218	211	232	235	235
» Nr. 33 . .	215	210	205	215	217	220
Kaninchen Nr. 1	490	460	470	nimmt zu		
» Nr. 2	680	650	675	»	»	
» Nr. 3	708	720	720	730	nimmt zu.	

Trotzdem wäre es auch für Hefen gewagt, ihnen jede krankmachende Fähigkeit abzusprechen. Es sei in dieser Hinsicht auf ausgesprochene Krankheitserscheinungen verwiesen, die von Hefen ausgehen können (Busse, Curtis, Gilchrist, Sanfelice, L. Rabinowitsch, Casagrandi, Tokishige, Hueppe etc. (18), und es sei weiter daran erinnert, dafs es immerhin möglich erscheint, dafs auch anscheinend ganz unschuldige Hefen bei besonderem Einführungsakt doch Krankheit erzeugen könnten. Der eigentliche Marasmus, den Tuberkelbazillen bei Injektion der Kulturen ins Herz machen, und der mit dem gewöhnlichen Verlauf der Tuberkulose bei Meerschweinchen gar keine Ähnlichkeit mehr hat, mahnt hier zur Vorsicht.

Weiter ventiliert Nakayama die Annahme, »dafs der Tierkörper eine Woche nach der Erstinfektion mit drei Agarkulturen (die meist verwendete Dosis) so sehr mit Giftstoffen, sei es dafs diese durch Zufall von Myzelien entstehen, oder dafs sie erst im Körper produziert werden, überladen ist, dafs das Leben der Tiere nicht die geringste Zunahme des Giftes mehr verträgt.«

Diesen Einwand widerlegte derselbe Autor dadurch, dafs er 12 Agarkulturen auf einmal injizierte, die die Tiere ebensogut wie die drei Agarkulturen vertrugen.

Ganz Ähnliches gilt auch für Hefe. Denn wurden auf einmal drei Agarkulturen von lebenden Blastomyzeten Meer-

schweinchen intraperitoneal injiziert, so vertrugen dieselben diese dreifache Dosis ebensogut wie nur eine Agarkultur.

Nakayama fand bei seinen Zweitinfektionen mit Aktinomyzes einen bedeutungsvollen Unterschied gegenüber dem Verhalten der Tiere bei der ersten Einspritzung, indem die Leukozyten in den späteren Stunden, statt an Zahl zuzunehmen, sich auffällig stark verminderten. Bail konnte bei ausgesprochener, hochgradiger Tuberkuloseüberempfindlichkeit an Meerschweinchen feststellen, daſs nach Injektion gröſserer Bazillenmengen überhaupt keine Leukozyten ins Peritoneum übertreten.

Bei meinen Hefeversuchen war von diesem Verhalten nichts zu finden. Auch beim überempfindlichen Tiere wandern Zellen anscheinend ungehindert in die Bauchhöhle ein, ein wesentlicher Unterschied in der Phagozytose, wie im Verschwinden der Hefen aus dem freien Peritonealraum gegenüber der Erstinfektion konnte trotz aller angewendeten Sorgfalt nicht mit Sicherheit aufgefunden werden. Das Einzige, was vielleicht festzustellen war, ist die auf S. 35 erwähnte gröſsere Labilität der polynukleären Zellen bei der Zweitinfektion, ein Befund, aus dem zurzeit irgendwelche Schlüsse nicht gezogen werden können. Die Hefeempfindlichkeit gleicht in ihrer Erscheinung vollständig jener Form der Tuberkuloseüberempfindlichkeit beim Meerschweinchen, welche Bail beschrieb, wo bei noch relativ wenig ausgebildeter Krankheit die Injektion gröſserer Bazillenmengen den Tod hervorrief, obwohl Leukozyten in gröſster Zahl in die Bauchhöhle einwanderten und darin bis zum Tode verblieben. Genau wie bei Hefe hatte dann das eitrige Exsudat keinerlei Wirkung im Tierversuch.

Im übrigen sei noch erwähnt, daſs bereits Nakayama die Vermutung, daſs die Hyperleukozytose der Peritonealhöhle für die Überempfindlichkeit von Bedeutung sein möchte, dadurch zurückweisen konnte, daſs er Meerschweinchen 1 ccm Aleuronatlösung intraperitoneal injizierte und am nächsten Tage das Meerschweinchen mit drei Agarkulturen von Aktinomyces + 4,5 ccm NaCl-Lösung. Es findet schon, wenn man so vorgeht, nach zwei Stunden eine sehr starke Leukozytose und Phagozytose statt, die

das Tier überlebt. Ein anderes Meerschweinchen bekam drei Agarkulturen + 4,5 ccm NaCl-Lösung und nach 6 Tagen 4 ccm Aleuronatlösung, beide wiederum intraperitoneal. Das Tier zeigte starke Leukozytose, sonst keine Erscheinungen. Bekam jedoch dasselbe am nächsten Tage wieder 3 Agarkulturen + 4,5 ccm NaCl-Lösung, so starb es nach 9 $^1/_2$ Stunden.

In Kürze sei noch darauf hingewiesen, dafs die vorliegenden Versuche keinerlei Anhaltspunkte für die Annahme der Tätigkeit von Antikörpern ergeben haben, die im Sinne von Pirguet und Schick die injizierte Hefe in eine giftige Modifikation umwandeln oder die Resorption von an sich giftigen Leibesbestandteilen im Sinne von Wolff befördern könnten. Von der Wirkung der Serumaktivität, die man sehen müfste, Agglutination oder Bakteriolyse, war nie das Geringste zu bemerken. Das stimmt überein mit den Angaben über Reaktionsprodukte des Organismus auf Hefeinjektionen, die ergeben hatten, dafs es nur schwer gelingt, gegen Hefe wirksame Sera herzustellen.

Malvoz ([19]) behandelte Kaninchen mit Blastomyzeten de Hay, Sanfelice und B. E. (aus einem Epitheliom) und ist zum Resultate gekommen, wie folgt:

»Des diverses propriétés susceptibles d'être acquises par un sérum d'animal immunisé, on ne constate in vitro dans le sang frais des animaux traités par les blastomycètes que le pouvoir agglutinant, et à un titre peu élevé, malgré la répétition des injections. Le pouvoir cytotoxique du sérum n'apparaît pas in vitro, soit à cause de l'absence d'anticorps sensibilateur dans les humeurs soit parce que la capsule des levures les protège contre les alexines.«

Hierher gehören auch die Arbeiten von Bissérie ([20]), Brouha ([21]) und Sanfelice([22]), der zwar Antikörper im Blute mit abgeschwächten Kulturen behandelter Tiere findet jedoch nicht im Blutserum in aktiver blastomyzetischer Infektion begriffener Tiere, auf die wir jedoch nicht näher eingehen können.

Auch das rasche Verschwinden der Überempfindlichkeit stimmt mit der Annahme von Antikörpern, die nach Art von Zytolysinen wirken würden, nicht überein, und so charakterisiert

sich die Überempfindlichkeit gegen Hefe als eng zu derjenigen gegen Aktinomyzes gehörig, während bei Tuberkulose natürlich nie ein Verschwinden sondern nur eine Steigerung der Überempfindlichkeit möglich ist.

Von grofser Wichtigkeit scheint die Feststellung zu sein, dafs abgetötete Hefe nicht mehr imstande ist, Überempfindlichkeit hervorzurufen, und dafs solche auch bei einer Überempfindlichkeit, die durch lebende Hefe erzeugt ist, nicht mehr tödlich wirkt. In meinen Versuchen wurde die Abtötung mit Azeton herbeigeführt, einem Mittel, das wohl als das schonendste bezeichnet werden mufs, da es nach übereinstimmenden Angaben (Buchner ([23])) auch die labilsten Fermente der Zelle, darunter die Zymase, ungeschädigt läfst. Dennoch ist eine solche Hefe absolut nicht mehr imstande, den Zustand der Tiere zu einem allergischen zu machen. Dabei sei darauf hingewiesen, dafs Bail bei Versuchen mit toten Tuberkelbazillen (Abtötung durch Hitze) an überempfindlichen Meerschweinchen nicht zu ganz sicheren Resultaten gelangen konnte.

Daraus ergibt sich aber für die Hefeüberempfindlichkeit und möglicherweise für die ganze Gruppe, der sie unzweideutig angehört, ein wichtiger Schlufs; entweder führt die Überempfindlichkeit gegen Hefe überhaupt gar nicht auf deren Körpersubstanz zurück, sondern wird durch das Leben der eingespritzten Zelle an sich, ihre Vitalität bedingt, oder die Ursache der Überempfindlichkeit ist ein Bestandteil der Hefezelle von so aufserordentlicher Labilität, dafs sie auch die schonendste Abtötungsmethode nicht zu überdauern vermag und mit dem Leben der Hefe selbst verloren geht. Beide Thesen brauchen, wie sofort ersichtlich, nicht im direkten Gegensatze zu stehen.

Zum Schlusse seien die Sektionsbefunde im allgemeinen zusammengefafst. Die Schädelhöhle und das Gehirn wurden nicht näher untersucht.

In der Pleurahöhle findet sich meist eine geringe Menge von gelblichem, klaren Exsudate, in dem sich einzelne Mikro- und Makrophagen und desquammierte Epithelien befinden. Freie Blastomyzeten wurden zwar mikroskopisch nicht gefunden, dennoch

wachsen reine Blastomyzetenkulturen aus demselben. Die Pleura parietalis ist etwas hyperämisch, sonst zeigt sie keine Veränderungen. Die Lunge ist gewöhnlich lufthaltig, seltener findet man atelektatische Herde, die eine geringe Infiltration in dem Bindegewebe, eine Desquammation von Alveolarepithelien und eine gröfsere oder kleinere Menge von Blastomyzeten in Alveolarräumen zeigen. Aufserdem findet man häufig hyperämische Partien in der Lunge, die mikroskopisch näher nicht untersucht wurden, aus denen man jedoch stets Blastomyzeten züchten konnte.

Im Herzbeutel findet man eine kaum veränderte Menge von Liquor pericardii, welcher keine Veränderungen aufweist. Die Herzmuskulatur zeigte bei etlichen Tieren trübe Schwellung leichten Grades, bei anderen Tieren war sie unverändert. Aus dem Herzmuskel wurden nie, aus dem Herzblute öfters Blastomyzeten gezüchtet.

Die Milz war vergröfsert, die Kapsel trüb, bedeckt von Eitermassen, die Pulpa weich, reichlich vorhanden, von gelbrötlicher Farbe. In derselben kann man mikroskopisch freie Blastomyzeten leicht erkennen und aus derselben wurden sie immer gezüchtet.

Die Niere ist nicht vergröfsert, die Kapsel leicht abziehbar, das Parenchym mehr oder weniger parenchymatös degeneriert. Mikroskopisch findet man Blastomyzeten, hie und da in Harnkanälchen und reichlicher in Glomerulis. Aus der Niere wurden dieselben auch in reinen Kulturen gezüchtet.

Die Nebenniere weist keine makroskopischen Veränderungen auf.

Die Leber war gewöhnlich etwas vergröfsert, ihre Kapsel trüb, bedeckt mit Eitermassen, das Parenchym mehr minder parenchymatös degeneriert. Aus der Leber liefsen sich reine Blastomyzetenkulturen gewinnen.

Die Darm- und Magenschleimhaut zeigt keine Veränderungen, nur in einem Falle schien sie etwas hyperämisch zu sein. Die Mesenterialdrüsen sind etwas vergröfsert, aus denselben kann man steht Blastomyzeten züchten.

In der Bauchhöhle befindet sich Exsudat, welches bei einzelnen Tieren bereits beschrieben wurde, Das Peritoneum ist hyperämisch (stellenweise findet man Hämorrhagien), und ist mit den bereits beschriebenen Eitermassen bedeckt. Das Grofsnetz ist gegen die grofse Kurvatur des Magens zusammengeschrumpft, mit Leber, Darmschlingen und Pankreas zusammengewachsen. Auf demselben befinden sich Knötchen, die vorzugsweise aus Makrophagen und freien Blastomyzeten bestehen. Beim Tiere Nr. 2, welches zufälligerweise zwei Injektionen überstanden hat und bei der dritten gestorben war, wurden zwei Geschwülste gefunden, die etwa haselnufsgrofs waren und subkutan in der Inguinalgegend safsen.

Dieselben wiesen an der Peripherie einen konsistenten Teil und in der Mitte erweichte Partien auf. Die erweichten Stellen bestehen aus poly- und mononukleären Leukozyten und aus Makrophagen. Ringsum befand sich Granulationsgewebe. Eine ähnliche Geschwulst wurde in der Bauchhöhle mit dem Pankreas verwachsen und an das Grofsnetz fixiert gefunden, und nach der von Busse angegebenen Methode behandelt.

[Hämateinlösung 15 Minuten.
Abspülen in Brunnenwasser 5 Minuten.
Dünne Karbolfuchsinlösung (Ziehl sche Lösung, einmal zu 20 Teilen destilliertes Wasser) $^1/_2$—24 Stunden.
Entfärben in Alkohol, wenige Sekunden bis einige Minuten.
Absol. Alkohol.
Xylol, Kanadabalsam.]

Wie die histologische Untersuchung ergab (Tafel I), besteht diese Geschwulst aus einem Granulationsgewebe, welches zwischen den Zellen verteilte Blastomyzeten aufweist. Dieselben sind rot gefärbt, dagegen die Gewebskerne blau. In der Mitte befand sich eine erweichte Stelle, wo man grofse Zellen, deren Kerne gegen die Wand gedrängt sind, und die in sich eine Menge von rot gefärbten, eingeschlossenen Blastomyzeten aufweisen sieht. Aufserdem sieht man dort einzelne polynukleare Leukozyten.

Literatur.

1. Richet, De l'anaphylaxie ou sensibilité croissante des organismes à des doses successives de poison. Archivio di fisiologia Jan. 1804, p. 129.
—, De l'action de la congestine sur les lapins et de ses effets anaphylactiques. Soc. de biol. 21. Jan. 1905.
—, De l'anaphylaxie après injections de congestine chez le chien. Ibidem.
2. Behring u. Kitashima, Über Verminderung und Steigerung der ererbten Giftempfindlichkeit Berlin. klin. Wochenschr. 1901, Nr. 6, S. 157.
3. Knorr, Experimentelle Untersuchungen über die Grenzen der Heilungsmöglichkeit des Tetanus. V. 102, 18.
4. Kretz, Zeitschr. f. Heilkunde, Bd. 23.
5. v. Pirquet u. Schick, Zur Theorie der Inkubationszeit. Wiener klin. Wochenschr. 1903. Nr. 26, 45.
—, Zur Frage des Aggressins. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 17.
—, Die Serumkrankheit. 1905.
—, Überempfindlichkeit und beschleunigte Reaktion. Münchener med. Wochenschr. 1906, Nr. 2.
v. Pirquet, Zur Theorie der Vaccination. Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte. Kassel 1903.
—, Allergie, Münch. med. Wochenschr., 1906, Nr. 30.
6. Arthus, Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin. Soc. de biol. 1903, 20. Juin, p. 817.
7. Rosenau u. Anderson, A study on the cause of sudden death folowing the injection of horse serum. Hyg. Lab. U. S. Pub. Health and Mar. Hosp. Serv. Washington 1906. Bull. Nr. 29.
8. A. Wolff, Über Grundgesetze der Immunität. Zentralbl. f. Bakt. 1904. Ibidem 1906. Bd. 40, Nr. 3. Münchener med. Wochenschr. 1906. Nr. 5. Das Heufieber, München 1906.
9. Courmont, Études sur les substances solubles prédisposantes à l'action pathogène de leurs microbes producteurs. Rev. de Med. 1891. Nr. 10. Ref. Zentralbl. f. Bakt., Bd. 13, S. 714.
10. Straufs u. N. Gamaleia, Recherches experimentales sur la tuberculose. Arch. de méd. experim. III. Juli 1899.
11. Babes u. Proca, Untersuchungen über die Wirkung der Tuberkelbazillen und über gegenwirkende Substanzen. Zeitschr. f. Hyg., XXIII, S. 331.
12. Detre-Deutsch, Superinfektion u. Primäraffekt. Wien. klin. Wochenschrift 1904, Nr. 27.
13. O. Bail, Überempfindlichkeit bei tuberkulosen Tieren. Wiener klin. Wochenschr. 1904, S. 30.
—, Über Giftwirkung von Tuberkelbazillen beim Meerschweinchen. Wien. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 46.

O. Bail, Der akute Tod von Meerschweinchen an Tuberkulose. Wien. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 9.

14. Finger u. Landsteiner, Sitzungsbericht d. kais. Akad. d. Wissensch. in Wien. M.-N.-Klasse. April 1906.
15. Rist, Sur la toxicité de corps de bacilles diphthéritiques. Soc. de Biol. 1903. Nr. 25.
16. Nakayama, Impfversuche mit Actinomyces asteroides Eppinger an Meerschweinchen. Arch. f. Hyg., Bd. LVIII.
17. A. Schattenfroh, Über die Beziehungen der Phagozytose zur Alexinwirkung bei Sprofspilzen und Bakterien. Arch. f. Hyg., 1896.
18. Kolle-Wassermann, Handb. der path. Mikroorgan.: Die Sprofspilze v. O. Busse. S. 661.
19. Malvoz, Sur les propriétés du serum des animaux, traités par les blastomycètes. Zentralbl. f. Bakt., 29.
20. Bissérie, Sérum agglutinant des levures. Soc. de biol., 23. II.
21. Brouha, Sur les propr. du sérum des cancereux au point de vue aux anticorps des levures. Zentralbl. f. Bakt. 1901, Nr. 25.
22. Sanfelice, Die Antikörper des Blutserums mit Blastom. behandelter Tiere. Zentralbl. f. Bakt. 32. S. 360.
23. E. Buchner, H. Buchner, M. Hahn, Die Zymasegärung. München und Berlin 1903. S. 243, 265 etc.



Verlag von R. Oldenbourg, München und Berlin.

Zur Kenntnis des Sielwassers.

Von

Max Rubner.

I.

Fast alle Städte geben bestimmte Vorschriften für den maximalsten Temperaturgrad, mit welchem Kondenswässer (von Maschinen) in Kanäle eingeleitet werden dürfen. Es ist dies mit Rücksicht auf die Haltbarkeit des Mauerwerkes und der Gesundheit der Kanalarbeiter von Bedeutung.

Merkwürdigerweise liegen sehr wenige genauere Messungen der Temperaturen im Kanalinneren vor. Ich habe daher einige Messungen vornehmen lassen. Da sich Luft und Wasser unter den im Kanal herrschenden Verhältnissen gut ausgleichen, habe ich die Untersuchung der ersteren ins Auge gefafst.

Gelegentlich einiger Fragen, welche die Kanalluft betrafen (1901, Januar), wurden mehrere Tage durch registrierende Thermometer und Hygrometer Wärme und Feuchtigkeit untersucht. In zwei gröfseren Stammsielen wurde die Luft stets mit Feuchtigkeit gesättigt gefunden. Im freien herrschte starke Kälte — 8 bis — 10°. Der eine Kanal, Gitschinerstrafse, welcher rund 140—370 Sek.-l führt, zeigte eine fast ganz gleichmäfsige Temperatur von + 12° bis 15° C., der andere am Potsdamertor (88—338 Sek.-l führend) ergab im Gegensatz zu dem ersteren eine ausgeprägt regelmäfsige an den einzelnen

Tagen wiederkehrende Temperaturkurve. Nach einem Minimum (5 Uhr früh) von + 17° wurden in steilem Anstieg um 6 Uhr früh des ersten Tages + 25° erreicht. Dann langsames Abfallen auf 24° bis 7 Uhr abends. Von diesem Zeitpunkt fällt die Kurve erst rasch, dann nach 12 Uhr nachts langsamer auf das Minimum + 18°. Ebenso verhielt es sich an den folgenden Tagen. Die Kanäle führen enorme Mengen ungenutzter Wärme aus den Städten ab; sie sind es, die offenbar auch nach Art einer künstlichen Heizung den Strafsenboden erwärmen und bei geringer Kälte die Schneeschmelze herbeiführen. Es ist bedauerlich, dafs sich bis jetzt keine Möglichkeit gefunden hat, diese Unsumme von verschleuderter Wärme anderweitig nutzbar zu machen.

Die beiden Kanalsysteme waren ein von seiten der städtischen Verwaltung als Beispiele a) eines Siels, das wenig oder kein Kondenswasser führt = Gitschinerstrafsensiel, und b) als Siel mit reichlichem Kondenswasser = jenes am Leipzigerplatz, bezeichnet worden. Man sah in der Tat bei b) die gröfsere Wärmeabfuhr bestätigt.

Auch läfst sich an der Wärmekurve leicht feststellen, zu welcher Zeit gröfsere Mengen Kondenswasser ins Sielnetz fliefsen.

Die Erwärmung des Sielwassers übt einen sehr merkbaren Einflufs auf die Austreibung von Gasen; im vorliegenden Falle kommt hauptsächlich Schwefelwasserstoff in Betracht. Der Geruch solch warmen Kanalwassers ist aber so kompliziert, dafs er eigentlich ein undefinierbares Gemisch darstellt und wohl, wie es in der Natur der Sache liegt, sehr wechselnde Dinge enthalten wird. Unter Umständen können bei Fabrikabwässern hochgradig giftige Gase in Frage kommen, deren Absorption in kühlerem Sielwasser möglich und erwünscht sein kann. In den »warmen« Kanälen gibt es natürlich auch umfangreichere Fäulniserscheinungen.

Da bis jetzt Analysen von Sielhäuten, wie es scheint, nicht mitgeteilt sind, habe ich einige Proben gesammelt.

Sie bestanden aus gallertiger Masse, enthielten vor allem Schimmelpilze, die das Gerüste bildeten, dazwischen Bakterien, namentlich Stäbchen, aber auch Kokken und Vibrionen.

Die sehr wasserreiche Substanz gab für die Trockensubstanz berechnet:

10,84 % Asche,
8,50 % N.

Chemische und biologische Klärung der Abwässer.

Von

Max Rubner.

Die Einleitung der städtischen Abwässer in offene Wasserläufe hat hinsichtlich ihrer sanitären Zulässigkeit eine recht schwankende Beurteilung gefunden, da man sich, wie ich auch a. O. (Archiv f. Hyg., Bd. XLVI, S. 5) auseinandergesetzt habe, über den Begriff Flufsverunreinigung und der zulässigen Grenzen einer solchen der differentesten Anschauung hingab, und nicht einmal es für nötig fand, eine gewisse historische und literarische Kontinuität zu wahren. Die drei Hauptetappen von der Lehre der Flufsverunreinigung sind leicht auseinanderzuhalten, indem man einmal darunter eine Flufsverunreinigung grobsinnlicher Art mit Fäulnis im Wasser und Schlammbankbildung verstand, dann wurde damit eine Veränderung des Wassers, die mit der Methode derWasseranalyse nachweislich war, bezeichnet, und endlich darunter eine bakterielle Veränderung durch mehr oder minder erhebliche Mehrung der Keimzahl im Flufswasser verstanden.

Die drei Typen objektiver Feststellung der Veränderung des Flufswassers wurden zu verschiedenen Zeiten unter Aufseracht-lassung früherer Begriffsbildung als sanitär wichtige Flufsverunreinigungen, d. h. als Vorgänge, welche die Gesundheit zu schädigen in der Lage waren, angesehen.

Damit waren, was die Überwachung der Flufsreinlichkeit betrifft, fortwährend sich steigernde Anforderungen verbunden.

Dies ergibt sich schon aus dem Umstande der verschiedenen Mischungsverhältnisse zwischen Flufs- und Kanalwasser, bei denen solche Zustände zutage treten. Wenn man recht krasse Übelstände gesehen hat, war die Verdünnung des Sielwassers durch Flufswasser eine sehr mäfsige, eine 20- und 25fache Verdünnung des Sielwassers mag ungefähr den Grenzen einer mit den gewöhnlichen Methoden nachweisbaren Verschlechterung des Flufswassers entsprechen, in bakteriologischer Hinsicht aber wird man nach Umständen selbst bei einer 5000fachen oder 10000 fachen Verdünnung noch von verunreinigtem Wasser reden können.

Da man so sehr ungleiche Dinge mit gleichen Namen belegte, versteht es sich von selbst, dafs die Aufgabe der öffentlichen Gesundheitspflege bezüglich der Verhütung der Flufsverunreinigung ganz verschieden aufgefafst wurde.

Die erste schärfere Formulierung einer Verunreinigungsgrenze für öffentliche Wasserläufe gab man in den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts. Gestützt auf rein praktische Erfahrungen kam man zu der Auffassung, dafs die Verhütung aller offenkundigen sinnenfälligen Nachteile der Flufsverunreinigung und eine Beseitigung aller berechtigten Beschwerden unter bestimmten Voraussetzungen möglich sei.

Man verlangte zum mindesten eine 15fache Verdünnung des Sielwassers, was im Durchschnitt für das Flufswasser einer Mehrung um 125 mg Rückstand für den Liter (77 mg Gelöstes), eine Mehrung um 70 mg N, 17 mg Cl Na gleichkam (zugrundegelegt die Mittelzahlen für Sielwasser nach König: »Die Verunreinigung der Gewässer«, Bd. II, S. 9, 1899), Beimengungen, die durch Selbstreinigung und Sedimentierung sich aber bald auf geringere Werte reduzieren mufsten.

Wichtige Untersuchungsergebnisse über Selbstreinigung der Flüsse waren damals durch deutsche und ausländische Forschungen bekannt geworden.

Man hatte aber noch eine weitere Bedingung für die Einleitung städtischer Abgangswässer erkannt, die Strömungsgeschwin-

digkeit eines Gewässers, die man namentlich wegen der Verhütung einer belästigenden Schlammbankbildung als bedeutungsvoll ansah.

Über die tatsächlichen günstigen Wirkungen der eben angegebenen Grenzwerte zur Unschädlichmachung der Einleitung der Abwässer kann kein Zweifel sein; eine wissenschaftliche Erklärung war man nicht in der Lage zu bieten. Wir sind aber heute sehr wohl imstande, die zum Verständnis nötigen Unterlagen zu bringen.

Zunächst ist es die Aufgabe des Flufswassers, das Sielwasser erheblich zu verdünnen, weil dadurch der Nährwert des Gemisches sinkt. Wie ich bewiesen habe, nehmen bei einer solchen Verdünnung die in der Raumeinheit zu irgendeiner Zeit entwicklungsfähigen Bakterien im Mafse der Verdünnung oder noch mehr ab.

Die Bakterien sind, wie Spitta in meinem Laboratorium nachgewiesen hat, die stetige Quelle der Sauerstoffzehrung des Flufswassers, namentlich verunreinigten Wassers.

Die Verdünnung des Kanalwassers im Flufswasser mindert also das für den Kubikmeter Wasser notwendige Sauerstoffbedürfnis, die »Respiration« des Wassers wird durch die Verdünnung mehr oder minder rasch eine aerobe. Zu dem Eindringen des Sauerstoffs trägt in sehr wesentlichem Grade die Bewegung des Wassers bei. Diese unterdrückt das Auftreten typischer Fäulnisprodukte, auch wenn Fäulnisbakterien primär nach ihrem Typus Stoffe zerlegen. Die Sedimentierung entlastet das Flufswasser rasch von einer grofsen Anzahl von Bakterien, was auch die aerobe Durchdringung fördert.

Man hat also auf rein empirischem Wege diese wesentlichen Bedingungen der Fäulnisverhütung richtig bemessen.

Natürlich gibt es noch eine ganze Menge von Fragen, die der Lösung harren; das wissenschaftliche Studium ist noch immer zu wenig systematisch und zerfällt in zu vielerlei Einzelprüfungen.

So glaube ich auch, dafs je nach der Eigenart des Flusses mehr oder minder häufig noch andere Faktoren auf die Art und Menge des Sauerstoffzutritts eine Bedeutung haben.

Mehrfache Beobachtungen im Hügel- und Gebirgsland lassen mir die Annahme, als müfste die gewaltige Durchmischung des Wassers bei Bergbächen zugleich mit dem rauhen Boden, den Sand und Felsblöcken, einen die Reinigung fördernden Einflufs darstellen, als wahrscheinlich erscheinen. Ich habe des öfteren bei Verschmutzungen solcher Wasserläufe eine weite Verschleppung des Unrates erwartet, aber das Gegenteil wahrgenommen; leider war es mir bisher nicht möglich, eine direkte exakte Untersuchung solcher Fälle vorzunehmen.

Man hat zuerst nach dem Vorgange von Pettenkofer angenommen, dafs die 15fache Verdünnung eines Sielwassers bei 0,5 m sekundlicher Geschwindigkeit des Flusses Fäulnis des Wassers und störende Sedimentierung ausschliefse. Ich glaube, dafs diese Werte, weit entfernt Standardzahlen zu bedeuten, doch im ganzen einen richtigen Kern enthalten und für bewegtes Wasser einen Anhaltspunkt für zielgemäfses Handeln bieten.

Die chemische Beschaffenheit des 15fachen verdünnten Sielwassers würde für technische Zwecke in vielen Fällen auf keine Bedenken stofsen. Aber Trinkwasser wird es nicht, nicht nur des Geschmacks wegen, sondern auch wegen des bakteriellen Zustandes.

Grether hat in meinem Laboratorium einige Proben Berliner Abwassers mit Leitungswasser verdünnt und dabei bestätigt gefunden (Archiv f. Hyg. Bd. XXVII, S. 192), dafs zwar die chemischen Abweichungen solchen Gemisches recht unbedeutend sind, dagegen die Bakterienzahlen 250000, 450000, 453000 Keime pro 1 ccm betragen, und höher sind, als man dem Verdünnungsfaktor gemäfs annehmen sollte; eine Tatsache, die sich aus einer späteren Beobachtung von Spitta erklärt, nämlich aus dem Loslösen von Bakterien aus den suspendierten Teilchen, an denen und in denen sie enthalten sind.

In keinem einzigen Falle werden nach mäfsig langem, freiem Lauf dieser Mischung im Flufs auch nur annähernd so viel an Bakterien gefunden werden als direkt nach der Verdünnung, weil sofort beim Einlauf des Kanalwassers ein Teil derselben zu sedimentieren beginnt, ein anderer, der am Grunde sich hält, sein

Sediment absetzt, ohne sich mit dem darüberfliefsenden Wasser gemischt zu haben. Wie die Versuche meines Laboratoriums gezeigt haben, ist ja das Kanalwasser von weit höherem spezifischen Gewicht als das Flufswasser (Monti, Archiv f. Hygiene, Bd. XLVI, S. 121).

Man kann also erfahrungsgemäfs eine Flufsverunreinigung durch obige Mafsnahmen verhüten und sofort die allmählich weiterfortschreitende Selbstreinigung des Flusses einleiten. Aber es kann doch noch das Profil eines Flufsbettes, wie ich schon früher angegeben habe, ein bisher noch nicht experimentell geprüfter Faktor ungleicher Reinigungstendenz sein.

Ein geringer Querschnitt mit grofser Tiefe oder grofser Querschnitt über seichtem Wasser, ungleiche Geschwindigkeit über das Mafs von 0,5 m pro Sekunde hinaus, sind Einflüsse, die durch die Regelung des Sauerstoffzutritts, durch die Berührung mit Sand und Geröll des Flufsbodens, durch Begünstigung oder Verhinderung der Planktonwucherung allerlei eigenartige Verhältnisse schaffen können, die experimentell noch nicht näher dargelegt sind.

Auf die bakteriologischen Unstimmigkeiten solcher Vorschriften, welche nur eine mäfsige Verdünnung des Sielwassers durch ein Flufswasser fordern, ist man natürlich sofort aufmerksam geworden, als man die natürlichen Wasserläufe auf ihren Bakteriengehalt untersuchte.

Millionen von Keimen im Kubikzentimeter eines Abwassers werden durch eine zehn- und hundertfache Verdünnung nur mäfsig geändert.

Der Flufs galt als verunreinigt und verseucht, wenn er reichlich Bakterien enthielt, da man in den Abwässern ja mit Bestimmtheit pathogene Keime als anwesend voraussetzen durfte.

Nunmehr wurden alsbald Vorschläge laut, welche vom Standpunkt der Bakterienzahl die Verhütung der Flufsverunreinigung aufs Korn nehmen wollten.

In der Tat wurden, namentlich zu Beginn der achtziger Jahre, die Flufsverunreinigungen sehr scharf beurteilt und den Städten harte Auflagen behufs Reinigung der Abwässer gemacht. Nicht

nur, dafs eine direkte Einleitung auch unter den günstigsten Umständen als unzulässig erklärt wurde, stellte man an den Reinheitsgrad von Abwässern geradezu widersinnige Anforderungen. Wenn man die Gesichtspunkte, die von einigen Heifsspornen auch amtlich vertreten worden sind, nämlich dafs Abwässer nicht mehr als 300 Keime im Kubikzentimeter beim Einlauf in den Flufs enthalten sollten, hätte durchführen wollen, so wäre man zu dem Schlusse gekommen, dafs das Abwasser reiner sein sollte als der Flufs, und dafs man ein Abwasser mit dem 20000fachen sterilen Wasser hätte verdünnen müssen, um diesen Effekt zu erzielen.

Aber selbst wenn man willkürlich annimmt, dafs die Keimzahl eines Flusses von 1000 auf 2000 vorübergehend wachsen dürfte, sind immerhin noch Verdünnungen auf das 6000—8000fache nötig, um diese Grenze zu erreichen — wenigstens der Rechnung gemäfs.

Ohne sich zu ganz klaren Vorstellungen durchzuringen, hat man aber bald auf diese extravaganten Forderungen verzichtet, und es war ein sehr zutreffender Gedanke, dafs man wie Praufsnitz u. A. als Leitbakterie zu beanstandender Verunreinigung das Bact. coli gewählt hat.

Eine Normierung eines bestimmten Bakteriengehalts im Flufswasser hat um so weniger Berechtigung, als man die Bakterien in ihrer Gesamtzahl gar nicht als Residuen eingeschwemmter Organismen betrachten darf, sondern nach bestimmten Zeiten und unter bestimmten Voraussetzungen mehren sich die Wassersaprophyten selbst.

So schwankte die Beurteilung des Flufswassers hin und her zwischen extremsten Forderungen der Reinheit und allen möglichen Vermittlungsvorschlägen für eine mildere Praxis.

Man hat sich von mancher Seite der Begrenzung der Bakterienzahlen für ganz überhoben betrachtet, weil man das Flufswasser überhaupt nicht als Trinkwasser gelten lassen wollte, das ist aber ein ziemlich gefährliches Argument.

Verzichtet man nämlich auf die Trinkfähigkeit des Flufswassers ganz, so sieht man nicht ein, warum man noch hohe Verdünnungsgrade des Kanalwassers fordert, da ja nur die einfacheren Grade einer störenden Verschmutzung zu beseitigen seien.

Diesen Schlufs will man allerdings doch nicht ziehen. Ohne feste Entscheidungsbasis läfst man sich in der Bemessung der zulässigen Flufsverunreinigung von »lokalen« Erwägungen leiten, ein Verfahren, das manchmal einem Ausweichen vor prinzipiellen Entscheidungen aufserordentlich ähnlich sieht. Die Bedeutung lokaler Einflüsse unterschätze ich durchaus nicht.

Ich denke aber, es gibt eine Reihe von Gründen, die es uns zum mindesten nahelegen, nicht bei dem Mindestmafs der Verdünnung (dem 15 fachen) stehen zu bleiben, das man zuerst aufgestellt hat.

Verdünnung und Geschwindigkeit allein entscheiden nicht allein über den Zustand des verunreinigten Wassers. Ein nicht zu unterschätzender Faktor ist die Temperatur des Wassers.

Bei einem Gebirgsflufs, der auch im Hochsommer nur 13 bis 15° C erreicht, da er Schneeschmelzwasser führt und einem Niederungsflufs mit 25—26°, der gerade im Sommer wenig Wasser führt, sind denn doch wesentliche Unterschiede vorhanden. Sind die Ufer reguliert oder nicht reguliert, so machen sich Differenzen insofern geltend, als im letzten Fall bei stellenweiser Stagnation des Wassers noch bei einer Verdünnung von 1:50 in Altwasserbecken oder ähnlichen stilleren Teilen des Wassers die oxydative Spaltung nicht mehr mit Sicherheit — nach den Versuchen meines Laboratoriums zu erwarten ist. Auch wird Fauna und Flora solcher ruhender Wasseranteile sehr bemerkbar sich ändern können.

Es wird sich wohl das Bedürfnis geltend machen, durch möglichst genaue Untersuchung bestehender Sielwassereinleitungen und ihrer Wirkung auf die Flüsse zu bestimmten formulierten Ergebnissen zu kommen, als es bis jetzt trotz der Zahl einschlägiger Analysen geschehen ist.

So kann durch systematischen Ausbau und Fortführung der Experimente eine schärfere, innerlich geklärtere Formulierung unserer Forderungen angebahnt werden, welche sich nach der Richtung bewegen wird, dafs man günstigstenfalls eine gröfsere Verdünnung als sie bisher in minimo gewählt wurde, wird zugrunde legen müssen.

Es hinterbleibt dann immer noch ein gewisser Grad bakterieller Verunreinigung als die Folge auch solcher Einleitung.

Wenn man aber, wie es richtig ist, den Gebrauch des Flusswassers als Trinkwasser perhorresziert, so ist anderseits doch auch ganz und gar kein Grund vorhanden, nunmehr vollständig auf einen gewissen Grad der bakteriellen Reinheit des Wassers zu verzichten und die verunreinigten Wegstrecken immer länger werden zu lassen.

Der Verdünnungsgrad der Bakterien des Wassers soll auch dort, wo es von den Anliegern für öffentliche, menschliche Trink- und Nutzzwecke nicht beansprucht wird, als ein Faktor von Bedeutung angesehen werden, man soll wenigstens die Wahrscheinlichkeit einer Ansteckungsgefahr soweit herabsetzen, dafs bei gelegentlich wenn auch ausnahmsweisem Gebrauch durch eine Schiffsbevölkerung etc., der doch nicht aus der Welt zu schaffen sein wird, nicht in jedem Falle ernste Bedenken wegen Ansteckungsgefahr geltend gemacht werden müssen.

Das so häufig in den Vordergrund gestellte Moment der lokalen Interessen darf, insoweit es zeitlich variable Momente betrifft, nicht allein ausschlaggebend sein. Die Wünsche der Anlieger eines Flusses sind nicht immer allein mafsgebend, um den zu erfordernden Reinheitsgrad zu bestimmen. Die öffentliche Gesundheitspflege und der Staat hat auch die Zukunft des Landes im Auge zu behalten und eine zielbewufste Flufswasserpolitik zu treiben.

II.

Ganz in engem Zusammenhang mit den Anschauungen und mit dem Begriff Flufsverunreinigung stehen die praktischen Mafsnahmen zur Reinigung der Abwässer. Ihre Ausbildung und Anwendung ist sehr von den theoretischen Vorstellungen an die Ansprüche eines »reinen« Flufswassers beherrscht gewesen.

Wenn mit der Verbesserung der Abwässer vor der Einleitung ein Anfang gemacht werden soll, ist es das richtigste, zuerst an die Beseitigung der suspendierten Teile zu gehen, weil man mit ihnen die Hauptmasse der optisch wie ästhetisch störenden und sanitär nachteiligsten Bestandteile aus dem Sielwasser wegnimmt. Übelstände durch klare, städtische Abwässer werden nur in seltenen Fällen zur Beobachtung kommen. Das Suspendierte ist der

bakterienreichste Teil des Abwassers, wenn auch die einfache Auszählung der Bakterien diesen Schlufs nicht ergibt. Ich habe schon an anderer Stelle Versuche mitteilen lassen, dafs man aus dem Sediment durch allmähliche, wiederholte Suspension in sterilem Wasser immer neue Bakterienmengen herausholen kann, die sonst der Untersuchung entgehen. Suspendierte Teile sind die Stellen, an denen Bakterien, unbeschadet einer Verdünnung des Sielwassers, einen gleichbleibenden konzentrierten Nährboden finden.

Das Suspendierte ist die Quelle der Bodenverschmutzung im Flufs, bietet immer die Gefahr, dafs diese Ablagerungen bei stärkerem Strom weitergetragen werden und in Örtlichkeiten erscheinen, wo man wegen der bei ruhigem Strom festgestellten weit kürzeren Verschmutzungsgrenze des Flusses an Verschleppungen von Abfallstoffen gar nicht denkt.

Die Sedimentierung ist, wie bekannt, bei völliger Ruhe eine weitgehende Reinigungsmethode. Wie Grether gezeigt hat (a. a. O. S. 193), erreichen wir bei Berliner Sielwasser in der vierten Stunde schon das Maximum. Leitet man solches gereinigtes Wasser unter denselben Bedingungen in einen Flufs wie das ungereinigte (Verdünnung 1 : 15) so hat sich im Laboratoriumsexperiment im Spezialfall ergeben:

	1 ccm enthält Keime	1000 ccm enthalten Gramm		
		Gesamt-trockensubst.	organ. Glühverl.	anorgan. Substanz
Ungereinigtes Wasser .	453 000	0,405	0.245	0,160
Geklärtes Wasser . .	294 000	0,070	0,036	0,034.

Der Einflufs der Klärung auf die chemische Beschaffenheit des Wassers war sehr bedeutend, geringer hinsichtlich des Bakteriengehalts, aber dies ist eine Täuschung, weil tatsächlich das ungereinigte Wasser viel mehr Bakterien enthält, als die Plattenzählung ergibt.

Von den bakteriellen Verunreinigungen abgesehen, würde man ein mehrfaches an »gereinigtem« Abwasser in den Flufs lassen können, wie von ungereinigtem Kanalwasser, wenn man nur gleiche chemische Verdünnungen des Wassers in beiden Fällen für zulässig erklärt.

Trotz der Einfachheit des Verfahrens haben die Sedimentierungsverfahren spät Einzug gefunden, weil man von dem Gedanken sich nicht losmachen konnte, es sollten vor allem die Bakterien möglichst vollkommen ausgefällt werden, und weil man in praxi bei der Sedimentierung einen etwas geringeren Nutzeffekt erzielt als bei Laboratoriumsexperimenten und diesen Nutzeffekt erhöhen wollte.

So sind die Kalkreinigung mit ihren Modifikationen, die Eisenfällung, das Kohlebreiverfahren in Aufnahme gekommen und zahlreiche Städte haben angefangen, damit ihre Abwässer zu reinigen und tun es noch.

Die chemischen Kläranlagen haben im allgemeinen nicht sehr befriedigende Resultate gegeben, wenn man von Spezialfällen absieht. Die einfache Kalkklärung war in jeder Form eine ziemliche Belastung der Städte und hat, was die Reinheit der Abwässer anlangte, wenig erreicht. Die grofse Menge von Niederschlägen war gar nicht zu verwerten. Wir haben auch Beispiele, wo trotz Kalkklärung die Flufsreinheit nicht weniger als tadellos gewesen ist. Selbst bei der hinsichtlich der Niederschläge immerhin noch günstigen Eisenfällung (z. B. in Leipzig), sieht man sich in neuester Zeit genötigt, auf ein Verfahren überzugehen, das die Menge der unverwertbaren Niederschläge vermindert und die Reinheit des geklärten Wassers erhöht.

Die bakterielle Reinerhaltung des Flufswassers wurde wohl in keinem Falle erreicht.

Das Radikalste ist, was die Niederschläge anlangt, noch die bei dem Degenerschen Kohlebreiverfahren gegebene Möglichkeit das Sediment des Kanalwassers zu trocknen und durch Verbrennen unschädlich zu machen.

Sieht man von der unseligen Schlammverwertungsfrage ganz ab, so kommt aber noch ein anderes Moment bei Kläranlagen in Frage.

Wie längst im Detail schon nachgewiesen und leicht verständlich ist, ist die vollkommene Beseitigung der suspendierten Stoffe bei dem chemischen Verfahren gegenüber einfacher Klärung nicht eben sehr hoch anzuschlagen, gelöste Stoffe aber werden nur in

beschränktestem Mafse angegriffen. Sterilität der Abwässer ist längst preisgegeben und wurde natürlich niemals erzielt.

Man wird auch nicht wohl behaupten wollen, dafs durch die fehlende Sterilität oder Keimarmut derartigen eingeleiteten Abwassers bei grofsen Flüssen ein ernstlicher Übelstand sich ausgebildet habe.

Die gereinigten Abwässer können aber immer noch unser Interesse beanspruchen, da sie trotz dieses Namens zweifellos vom sanitären Standpunkt nicht den Grad von Unschädlichkeit aufweisen, den man gemeinhin voraussetzt. Sie verdienen Beachtung dort, wo die zur Verdünnung nötigen Wassermengen nur mäfsige sind. Diese Frage möchte ich im nachstehenden noch etwas näher besprechen.

Die chemisch gereinigten Abwässer enthalten immer noch viel fäulnisfähiges Material und geben dort, wo sie unverdünnt längere Wegstrecken geleitet werden müssen, zu Klagen wegen Fäulnis Veranlassung.

Derartige Fälle haben sich in der neueren Zeit, wie es scheint, vermehrt. Nicht allein liegt der Grund in den prinzipiellen Mängeln der Methode, als vielmehr in dem nicht seltenen Versagen des Klärvorgangs durch ungenügende Handhabung der Klärmittel und aus anderen Gründen.

Weit bessere Ergebnisse haben bekanntlich die biologischen Kläranlagen, welche nach den Rieselfeldern, wenigstens was Wasserbeschaffenheit anlangt, die besten Resultate aufweisen.

Nur läfst die technische Durchführung auch manches zu wünschen übrig, so dafs Versager nicht eben ganz selten vorkommen.

Die Verschmutzung von wasserarmen Bächen und kleinen Flüssen durch mangelhaft gereinigte Abwässer ist wohl unbestritten.

Ich habe auch Grund zur Annahme, dafs die Einleitung namentlich chemisch geklärter Abwässer auch bei nicht allzu wasserarmen Flüssen allmählich zu einer Zunahme der Bakterienzahl Veranlassung gibt, die zunächst freilich nur auf Saprophyten zu beziehen ist, aber doch den Beweis liefert, dafs viel nährendes

Material vorhanden ist, was gegebenenfalls auch bei der Ausstreuung von Parasiten als bedenklich angesehen werden kann.

Diese übermäfsige Einleitung geklärter Abwässer kann eine Kalamität werden, sie vollzieht sich langsam und unbemerkt, weil keine Fällungen und Sedimente auftreten, aber schliefslich kann doch eine erhebliche Flufsstrecke in Mitleidenschaft gezogen werden.

Die Überwachung der Betriebsergebnisse von Kläranlagen ist noch in den Anfängen; sie ist aber dringend nötig. Die Methoden zur Prüfung sind hauptsächlich mit Rücksicht auf das Studium des Betriebes von biologischen Anlagen ausgedacht, noch in den Versuchsstadien. Ich will mich in eine nähere Besprechung derselben hier nicht einlassen. Im grofsen und ganzen ist man zu einer Prüfung der »Faulfähigkeit« des Wassers zurückgekehrt, d. h. zu der Feststellung, ob ein Wasser, längere Zeit aufbewahrt, noch die Zeichen der Fäulnis gäbe; hat aber bei den schwankenden Ergebnissen solcher Prüfung versucht, noch andere Kriterien heranzuziehen.[1])

Fäulnis ist ein ziemlich vager Begriff; praktisch versteht man darunter Einwirkung und Wachstum von Kleinlebewesen unter Bildung von stinkenden Zersetzungsprodukten, worunter namentlich S-haltige Produkte und Spaltstücke von eiweifsartigen Stoffen oder diesen nahestehenden Körpern gemeint sind.

Jedenfalls ist sie eine Funktion

1. der Gröfse des Sauerstoffzutritts,
2. der Gröfse der Verdünnung der Nährstoffe (s. o.),
3. der Art der Keime,
4. der Art der Nährstoffe, es müssen komplexe Verbindungen vorhanden sein.

1 und 2 entscheiden in der Praxis des täglichen Lebens über die Wahrnehmbarkeit der Fäulnis. Ein grofser Teil der in natürlichen Verhältnissen vorkommenden Keime spaltet SH_2 ab

1) Siehe z. B. die Zusammenstellung bei Spitta und Weldert, Mitteilungen der Kgl. Prüfungsanstalt f. Wasserversorgung u. Abwässerbeseitigung. 1906. Heft 6, S. 7.

und bildet aus Eiweiſs, Polypeptiden, Aminosäuren und Diaminosäuren NH_3 und stinkende Produkte (niedere Fettsäuren, Indol).

Doch sind hier nicht allein Qualitätsfragen, auch vor allem Quantitätsfragen zu entscheiden. Es ist naheliegend, andere als die bisher begangenen Wege einzuschlagen.

III.

Aber abgesehen von dieser Frage des Nachweises der Fäulnis und ihrer Kontrolle haben wir zurzeit auch von den schon lange als Reinigungsverfahren verwandten technischen Einrichtungen überhaupt noch zu wenig Unterlagen über den Grad der Unreinheit, mit dem die gereinigten Abwässer solche Kläranstalten verlassen.

Es war mir daher erwünscht, in anderer Weise als es bisher geschehen ist, aus eigner Erfahrung und wie es die Praxis des täglichen Lebens bot, näheres über die Beschaffenheit der Rohwässer und Reinwässer solcher Kläranstalten zu erfahren.

Die Versuche beziehen sich auf vier Anlagen mit chemischer Reinigung und drei Anlagen mit biologischem Klärverfahren.

Herr Dr. Hutcheson aus Schottland hatte 1903/04 die Aufgabe unternommen die Angelegenheit näher zu prüfen; auf Grund seiner Versuchsprotokolle will ich im nachstehenden eine kurze Schilderung der einschlägigen Verhältnisse geben.

Die Beurteilung von Abwässern durch die übliche Methode der Analyse ist nicht leicht, die Resultate geben zu mancherlei Zweifel Anlaſs. Neben Trocken- und Aschegehalt wird meist die organische Substanz mittels der Permanganatmethode geprüft, allenfalls auch der N-Gehalt nach Kjeldahl und das Albuminoidammoniak. Die Methoden sind zum Teil anerkannt ungenau, wie die Permanganatmethoden, und um so unverwendbarer, als sich durch die Reinigungsmethoden nicht alle Schmutzbestandteile gleichmäſsig in Rohwasser und Reinwasser geändert haben, sondern Rohwasser und Reinwasser spezifische Unterschiede aufweisen.

Der Stand dieses Wissens schien es mir zu rechtfertigen, einen Versuch der Analyse in gröſserem Umfang wiederholen zu lassen,

den ich vor einigen Jahren gemacht habe, nämlich die Bestimmung der organischen Substanz nach ihrer Verbrennungswärme.

Die Untersuchung sollte einen Überblick über den Grad der Reinigung der Abwässer im allgemeinen geben. Es war nicht möglich und auch gar nicht erstrebt, längere Reihen auszuführen, man mufs ja auch bei solchen mit Unsicherheiten rechnen. Es sollte sich nur darum handeln, die Stoffe, insoweit sie abgebaut sind oder nicht möglichst gut zu charakterisieren.

Dies kann dadurch erreicht werden, dafs man den N-Gehalt des Roh- und Reinwasser mitbestimmt. N-haltig sind die Nährstoffe, welche zum Aufbau der Bakterien dienen, sie sind auch die Grundlage für die Fäulnisfähigkeit. Die N-Bestimmung wurde nach Kjeldahl ausgeführt. Sie wird von der Anwesenheit der Nitrate und Nitrite unter Umständen sehr gestört. Es ist daher notwendig, um den Gesamtstickstoff aufzufinden, gewisse Modifikationen der Kjeldahlschen Methode anzuwenden, jene nach Förster oder jene nach Jodlbauer. Zur Kontrolle wurde der N nach Kjeldahl in 25 ccm Kaliumnitrat = 0,0064 g N bestimmt und erhalten:

a) nach Förster	b) nach Jodlbauer
0,00672	0,00532
0,00672	0,00532
0,00672	0,00532
0,00728	0,00532.
0,00700	
0,00671	

Die Zahlen nach Förster fielen demnach etwas zu hoch, jene nach Jodlbauer zu klein aus; wir entschieden uns wegen der Gleichartigkeit der Resultate für die letztere Methode.

Selbstredend mufste in den Fällen, wo Trockensubstanz verwandt wurde, unter Säurezusatz eingedampft und konzentriert werden; es wurde Oxalsäure benutzt.

Sollte man das Bedürfnis fühlen, den organisch gebundenen N für sich zu bestimmen, so empfiehlt sich die Feststellung des Albuminoidammoniaks durchaus nicht, sondern die Kombination der Kjeldahlmethode mit der direkten Bestimmung des Am-

moniaks. Ich habe gesehen, dafs sich auf diesem Wege vortreffliche einwandfreie Resultate erzielen lassen.

Die Verbrennungswärme gibt einheitlich, einwandfrei alle organischen Stoffe zusammengenommen an. Die Ausführung der Methode darf aber nicht schablonenhaft zur Anwendung kommen. Die Substanzen der Abwässer verbrennen selten ohne weiteres glatt. Hier hindert der grofse Aschegehalt. Es müssen also erhebliche Zuckerzusätze gemacht werden.

Schwierigkeiten hatte die Berthelotsche Methode aber auch dann zu überwinden; in einigen Fällen, bei welchen das biologische Klärverfahren angewendet worden war und sehr reines Wasser vorlag, hinterblieb nach dem Eintrocknen eine Mischung, welche zwar noch etwas verbrennlichen Kohlenstoff enthielt, wovon ich mich überzeugte, aber im Kalorimeter nicht zu einer glatten Verbrennung zu bringen war.

Da es sich nur um kleinste Mengen verbrennlicher Materie handelte, so kommt dieser Übelstand für die weiteren Betrachtungen nicht sehr in Frage.

Bei reichlichem Gehalt an Salpeter und salpetrigsauren Salzen darf nur in neutraler Reaktion abgedampft werden. Man nimmt nur soviel Oxalsäure, als hierzu nötig erscheint. Verdampft man reichlich Oxalsäure mit reichlichen Mengen von salpetrigsaurem Kali, so entweichen Dämpfe von salpetriger Säure.

1,0173 g Oxalsäure = 0,7263 wasserfrei
+ 0,5758 KNO_2
= 1,3021
geben 1,1278 g.

Ähnlich bei Anwendung von KNO_3

1,1545 g Oxalsäure = 0,8243 wasserfrei
+ 0,6105 KNO_3
= 1,4348
geben 1,094 g Rückstand,

auch hierbei entweichen Dämpfe von NO_2.

Die Feststellung der Trockensubstanz geschah bei 98 bis 100°, die der Asche in üblicher Methode. Beide Verfahren

bieten bekanntlich schon bei den Trinkwässern viele Fehlerquellen, noch mehr Bedenken liegen bei ihrer Benutzung für Abwässer vor. Sie geben nur Annäherungen und führen, wie in stark nitrat- und nitrithaltigen Substanzen, zu unsicheren Ergebnissen.

Zur Charakterisierung der organischen Substanzen mufs man daher einen andern Weg einschlagen.

Dies gelingt in folgender Weise:

Kennt man den N-Gehalt und die Verbrennungswärme der organischen Substanz, so gewinnt man durch die Relationen zwischen N und Cal. einen weiteren Einblick in die Natur der vorliegenden Gemische, denn, Stoffe, wie sie im Harn enthalten sind, zeigen, wie ich zuerst bewiesen habe, eine Relation von $\frac{\mathrm{Cal}}{\mathrm{N}} = 5 - 8$, Eiweifskörper geben $\frac{\mathrm{Cal}}{\mathrm{N}} = 34$, Kot $1 = 70$, Werte darüber hinaus lassen auf die Anwesenheit von Fett, Stärke, Zellulose schliefsen. Es wäre auch nicht schwierig, durch Kombination mit der Extraktion des Fettes noch einen Schritt weiter zu kommen.

Die Chloride wurden mit Silberlösung titriert sowohl im ganzen Gemische als im Filtrat eines Chamberlandfilters. Die suspendierten Substanzen enthalten kleine Mengen von Chloriden.

Ich schicke den analytischen Resultaten einige kurze Bemerkungen über die Abwässer voraus.

P. betrifft eine Entwässerungsanlage für 2000 bis 3000 Personen, welche zugleich die Abgänge eines Schlachthofs aufnimmt. Geklärt wird mit Kalkmilch. Das Wasser war trübe, schwärzlich grau und faulig.

Das gereinigte Wasser gelb, riecht nach Trimethylamin; enthält feine Schwebestoffe, ist stark alkalisch.

R. Anlage für 18000 Personen, reichliche Abwässer aus Schweineställen und Pferdeställen, das Wasser stinkend u. faul.

Chemische Klärung nachträglich Sand- und Kohlefiltration. Gereinigtes Wasser gelb, geruchlos, stark alkalisch.

T. Anlage für 12000 Personen, Abgänge von Fabriken, Kohlebreiverfahren. Gereinigtes Wasser schwach gelb, etwas trübe.

O. kleiner Ort, wie T.

Gr. kleine biologische Anlage für 200 Personen. Wasser schmutzig, schwärzlich grau, faulig. Gereinigtes völlig klar, farb- und geruchlos.

L. Anlage eines kleinen Ortes, für mehrere tausend Personen, wie Gr.

W. mittlere Stadt, neue biologische Anlage. Das Wasser wird nach der Klärung noch gerieselt. Die Analysen geben die Ergebnisse des gerieselten Wassers.

P, R, T, O betreffen demnach chemisch klärende Anlagen **G, L, W** biologische Verfahren.

Nachstehende Tabelle enthält die Analysen der Trockensubstanzen.

Die Trockensubstanz enthält:

	Asche-gehalt in %	Verbrenn.-Wärme pro 1 g	N-Gehalt in %	Asche-gehalt in %	Verbrenn.-Wärme pro 1 g	N-Gehalt in %	
	ungereinigt			gereinigt			
P.	39,2	4,271	12,3	69,4	1,030	2,00	chem. Klärung
R.	38,2	4,217	3,61	85,2	0,414	1,50	
T.	45,0	3,213	2,54	62,1	1,040	4,65	
O.	47,0	2,134	3,12	56,8	0,840	3,82	
G.	54,8	2,113	1,85	68,0	sehr klein	2,68	biolog. Reinigung
L.	67,6	1,138	3,82	71,0	sehr klein	6,48	
W.	45,8	4,485	13,56	80,4	0,440	0,87	

Aus ihnen sind noch keine weitgehenden Schlüsse zu ziehen; nur einer ist generell und gesetzmäſsig hervortretend: Die Zunahme des Aschegehalts der gereinigten Wässer. Im übrigen werden die einfacheren Beziehungen ganz verdeckt durch den wechselnden Aschegehalt; ich berechne daher die Werte auf aschefreie, organische Substanz.

Berechnet auf organische Trockensubstanz.

	1 g kg-Kal.	% N ungereinigt	N : Kal.	1 g kg-Kal.	% N gereinigt	N : Kal.
P.	7,024	20,23	35	3,333	6,53	51
R.	6,823	5,84	117	2,800	10,11	28
T.	5,836	4,62	126	2,744	12,5	22
O.	4,026	5,86	69	1,944	8,84	22
Mittel	5,927	9,14	87	2,705	9,50	39
Gr.	4,674	4,09	114	—	(8,37)	—
L.	3,523	11,83	21	—	(22,35)	—
W.	8,275	25,0	33	2,245	4,53	49
Mittel	5,494	13,64	56	0,748	12,42	16

Betrachten wir zuerst die Rohwässer.

Der Verbrennungswert der organischen Substanz dieser sieben Abwässer ist wechselnd, was bei der Verschiedenheit der Orte und Anlagen, denen sie entstammen, kaum auffallend erscheint.

Doch sind durch Zufall in beiden Gruppen von Rohwässern sehr ähnliche Mittelzahlen erhalten worden: 5,927, 5,494 Cal., was die Vergleichbarkeit der Resultate gewährleistet.

Eine Kläranlage, die nur zu Versuchen diente, »L.«, hatte zeitweise als Rohwasser einen Zulauf, der überhaupt nur wenig verunreinigt schien und daher auch ein Abwasser lieferte, das klar und rein wie ein Trinkwasser war. Diese Proben sind nicht mitverwertet. Es führte dabei nach einer Analyse bei 32,2 % Asche und 1,34 % N der Trockensubstanz nur 0,942 kg Kal. pro 1 g Substanz, im gereinigten Wasser 31,1 % Asche und 0,25 % N, und Spuren verbrennliche Substanz.

Aufserordentlich schwankend ist der N-Gehalt der organischen Substanz der Rohwässer gewesen. Ein Vergleich des Sielwassers von Grofsstädten wird nicht im entferntesten solche Unterschiede ergeben, wie diese bei den kleinen Gemeinden: 4,1 % bis 25 %. In einem Falle bei 20 % N-Gehalt war sehr viel von Ammoniaksalzen vorhanden. Das Rohwasser zeigte aber

einen Grad der Zersetzung, wie er nach meinen Erfahrungen im Sielwasser Berlins z. B. gar nicht vorkommt.

In dieser Hinsicht spielt die Beimengung von Harn natürlich die gröfste Rolle; auch wohl eiweifshaltige Stoffe (Schlachthöfe) und Harn wie z. B. bei P. Warum W. soviel N in den Abwässern zeigt, läfst sich nicht eruieren.

Oxydierter N war in den Rohwässern wenig vorhanden, dies zeigten auch die geringen Unterschiede in der Analyse des N zwischen der einfachen N-Bestimmung nach Kjeldahl und nach Jodlbauer.

Das Verhältnis von N : Cal ergibt grofse Schwankungen zwischen 1:21 bis 1 : 126. Hierfür kommt vor allem die Beimengung von Kot, wohl auch von N-armen aber kohlestoffreichen Fabrikwässern in Betracht. Berliner Kanalwasser gab nach meinen Untersuchungen (Archiv. f. Hyg., XLVI, p. 35):

	$\frac{Cal}{N}$
Probe I . .	109
Probe II . .	86

	für die suspendierten Teile	für die gelösten
I	125	50
II	112	50.

Die höheren Werte R, T, Gr, kommen dem Berliner Wasser sehr nahe, die anderen nähern sich den Werten für Wasser mit wenig suspendierten Bestandteilen und sinken noch unter die angegebenen Werte für das Berliner Wasser. Die Suspensa hängen von menschlichen Abgängen, namentlich auch vom Kot der Tiere mit ab. Bei P. ist viel Blut im Abwasser vorhanden.

Daraus folgt, dafs man bei weiterer Vornahme solcher Experimente am besten eine getrennte Untersuchung von Suspendiertem und Gelöstem ausführen sollte.

Was nunmehr die gereinigten Abwässer anlangt, so ist im voraus zu bemerken, dafs die Abgänge der chemischen

Kläranstalten überhaupt keineswegs immer klare Wässer liefern, sondern häufig noch mehr oder minder trübe.

Bei den Abwässern müssen wir jene der chemischen und der biologischen Reinigungsverfahren streng auseinanderhalten.

Bei ersten ist nur bei P. der N-Gehalt des Abwassers kleiner wie jener des Rohwassers, sonst wesentlich gröfser. Kot, Speisereste, Suspendiertes verschiedenster Art, das reich an verbrennlichem Kohlenstoff ist, wird, wie ich gezeigt habe, zuerst gefällt. Diese Stoffe müssen bei P. sehr N-reich gewesen sein (Fleischfasern vom Schlachthof?). Das Verhältnis im gereinigten Wasser sinkt auf 1 N : 31 Kal., bleibt kleiner als bei den löslichen Substanzen des Berliner Sielwassers, weil durch das Klärverfahren auch noch zum mindesten lösliche Teile der Fäces von Menschen und Tieren mit ausgefällt werden. Sonach würde diese Klärung eine geringe Verbesserung des Abwassers auch qualitativ gegenüber den einfachen Sedimentierungsverfahren bedeuten.

Die Verbrennungswärme der gereinigten Wässer ist kleiner als die der organischen Substanz des Rohwassers. Dies ist in allen Versuchen der Fall gewesen. Bei den chemisch gereinigten Abwässern sinkt der Brennwert der organischen Substanz auf mehr als die Hälfte.

Auch dies beweist und erhärtet die aus dem Quotienten $\frac{\text{Cal}}{\text{N}}$ gezogenen Schlüsse; der chemische Charakter des »Reinwassergemisches« ist ganz anderes wie jener des Rohwassers.

Die organische Substanz hat zwischen 1,944—3,333 kg Kal. Verbrennungswärme. 1 g Harnstoff liefert 2,523, verschiedene Harne bis 3,101; noch weniger Verbrennungswert als Harnstoff hat das in faulen Abwässern reichlich enthaltene kohlensaure Ammoniak.

Vor allem mufs man aber bedenken, dafs in diesen Fällen bei Abwässern die Bestimmung der organischen Substanz mit grofsen Ungenauigkeiten verknüpft ist.

Trotz des niedrigen Wertes für die Verbrennungswärme der organischen Substanz müssen tatsächlich Körper, die noch zu

den Endstufen des Harns keineswegs abgebaut waren, vorhanden gewesen sein. Denn bei Harn erhalten wir nur Relationen von N : Cal wie 1 : 5 — 1 : 12 (Kinderharn). Hier bei der chemischen Klärung, wie schon angeführt, 1 : 22—28 für normale Kanalreinwässer.

Die Aschebestimmung wie Trockenbestimmung haben ebenfalls erhebliche Fehlerquellen. Häufig geht bei der Trockenbestimmung der Verlust zu weit, wenn man bei hoher Temperatur und lange Zeit trocknet. Wir haben deshalb bei 98°—100° die Trocknung vorgenommen. Bei der Veraschung hat man alle Fehler, welche bei der Wasseranalyse oft genug besprochen worden sind, zu erwarten. Vor allem mehrt die Anwesenheit von Ammoniaksalzen die »organische Substanz«.

Es ist daher richtiger und einfacher bei den Schlüssen, sich an die Relationen zwischen N und Cal, die von all diesen Fehlern frei sind, zu halten.

Wende ich mich nunmehr zu den biologisch geklärten Abwässern, so kann hier der Versuch W ausscheiden. Diese Kläranlage lieferte nach dem Koksfilter ziemlich unbefriedigendes Wasser; es wurde daher noch gerieselt. Aber auch diese Prozedur giebt noch ein Wasser, das nichts vor einer chemischen Reinigung voraus hat.

Gr. und L. gaben bei der Verbrennung nach Berthelot keine sicheren Ergebnisse. Aber so viel ist gewifs, dafs nur mehr kleinste Mengen verbrennlicher Substanz vorhanden waren; bei Veraschung zeigte sich auch nur eine unbeträchtliche Kohlebildung. Ich beabsichtige diese Untersuchung von biologisch geklärten Abwässern nach der Richtung der Gründe, welche ein Versagen der Verbrennung ergeben, weiter zu verfolgen.

Auch die Aschebestimmung bzw. Bestimmung der organischen Substanz ist in diesen Fällen, wo fast nur Nitrate und Nitrite neben einigen anderen Salzen gefunden werden, ein problematisches Unternehmen. Je mehr Nitrite vorhanden sind, um so fehlerhafter wird das prozentuale Ergebnis. Wir können daher auf die Prozentzahlen keinen Wert legen.

Aus der Tatsache, dafs die bei chemischer Klärung gefundenen Stoffe bei biologischer Klärung vollkommen abgebaut werden (wie dies übrigens schon längst als Wirkung der Selbstreinigung des Bodens erkannt war), folgert ohne weiteres, dafs die chemisch geklärten Abwässer als Nährstoffe für Bakterien zu betrachten sind und zwar nahezu in vollem Umfange der ganzen organischen Substanz.

Die methodische Prüfung gibt uns, wie wir gesehen haben wird, einen genauen Aufschlufs über die Wichtigkeit der beiden prinzipiellen Reinigungsmethoden des Abwassers. Wenn man auch immerhin die chemische Klärung nicht ganz zur Seite legen kann, zeigt sich doch die grofse Überlegenheit auf Seite der biologischen Klärung.

Ich hatte nicht die Absicht, die gesamten quantitativen Leistungen der beiden Abwasserreinigungsmethoden messen zu lassen; dazu sind sehr lange Reihen nötig, aber man kann doch an dem Vergleich der Konzentrationen des frischen Rohwassers und des gereinigten, auch aus diesen Experimenten Schlüsse ziehen.

Ich gebe daher im nachstehenden eine Zusammenstellung der Ergebnisse Dr. Hutchesons auf 1 cbm Abwasser berechnet.

1 cbm lieferte:

Anlage	Ungereinigt					Gereinigt				
	Trocken-substanz	Chlor	N Kjel-dahl	N Jodl-bauer	kg-Kal.	Trocken-substanz	Chlor	N Kjel-dahl	N Jodl-bauer	kg-Kal.
P.	1847,5	188,5	226,0	228,7	7 891	2131,0	217,5	43,7	44,1	2196
R.	5675,0	424,5	201,1	205,3	23 929	1152,5	225,0	14,4	17,4	478
T.	1432,5	142,0	39,5	39,6	4 603	1116,5	191,5	49,9	51,9	1162
O.	2735,0	124,0	85,6	85,6	5 877	1426,2	108,2	41,2	54,7	637
Mittel	2922,5	219,7	137,6	139,8	**10575**	1456,5	185,5	37,3	42,0	**1118**
Gr.	892,5	62,5	16,3	16,6	1 886	917,5	59,5	2,4	24,0	—
L.	1115,0	106,7	52,6	52,1	815	938,5	99,3	0,13	7,1	—
W.	2418,8	396,4	371,5	372,5	12 306	1595,0	348,5	13,5	13,1	703
Mittel	1475,4	188,5	146,8	197,1	**5 002**	1148,6	169,1	8,6	14,7	**234**

Die Tabelle führt Trockensubstanz, Chlor, N und Verbrennungswerte für Rohwasser und Reinwasser pro 1 cbm auf. Roh- und Reinwasser decken sich praktisch im Volumen nicht ganz — aber wenn man kleine Unrichtigkeiten bei Seite läfst, kann man annehmen, dafs eine Volumänderung nicht eintrete.

Der Reinigungseffekt für den N ist bei dem chemischen Verfahren immerhin erheblich — bei dem biologischen aber sozusagen vollkommen.

Der Reinigungserfolg nach der Verbrennungswärme kenntlich ist bei dem biologischen Verfahren, das fast eine völlige Mineralisierung erreicht, ein aufserordentlicher. Auch die chemischen Methoden haben ihre gute Seite und reduzieren die organische Masse sehr erheblich, hinterlassen aber immer noch einen recht respektablen Rest.

Der Reinigungseffekt der chemischen Methode bewegt sich um den Mittelwert 1118 kg Kal. pro 1 cbm ziemlich unabhängig von der Beschaffenheit des Rohwassers, solches Wasser ist noch reich an zersetzbarem Stoffe.

Im Laboratoriumsversuch habe ich bei Berliner Sielwasser im günstigsten Falle durch Beseitigung alles Suspendierten

75,8 % des N und 88,7 %

des Verbrennlichen beseitigt.

Bei den oben von Dr. Hutcheson untersuchten Kläranlagen wurde im Mittel:

vom N: 37,8 % und vom Verbrennlichen 95,3 % entfernt,

das stimmt genügend mit der allgemeinen Annahme, dafs die chemische Klärung hauptsächlich nur die suspendierten Teile ausscheidet.

Die biologische Klärung nimmt den Rest der organischen Substanz weg und mineralisiert den N. — Man vergleiche diesbezüglich auch die Differenz zwischen den Ergebnissen der Kjeldahlmethode und nach Jodlbauer bei Versuch Gr. und L.

Ich glaube hiermit den Beweis erbracht zu haben, dafs es uns nicht an Mitteln fehlt, die in den Abwässern auftretenden

Substanzen genauer zu definieren als es bisher der Fall gewesen ist.

Aus den Ergebnissen folgt, dafs der Ableitung chemisch geklärter Abwässer mehr Aufmerksamkeit zugewendet werden sollte, und dafs man sie nicht in beliebiger Masse einem Flufswasser beimengen sollte. Schlammbildner sind sie allerdings nicht (von der Kalkklärung abgesehen), aber es sind reichlich Körper vorhanden, welche für Mikroorganismen als Nahrungsstoffe gelten können.

Gewifs sind sedimentführende Abwässer nach jeder Richtung hin die Ursache gröfserer und grober Mifsstände und Gefahren als die geklärten.

Welche Veränderungen ein Flufs nach Einleitung dieser Abwässer erfährt, läfst sich nicht aus dem Verhalten des geklärten Wassers allein entnehmen, weshalb auch die Bestimmung der Faulfähigkeit nur bedingten Wert im Hinblick auf die hier besprochene Flufsverunreinigung haben wird.

Im Flusse selbst liegen ja auch Nährwerte vor, welche möglicherweise latent bleiben, aber sich äufsern, wenn durch ein Abwasser noch weitere Bestandteile dazu kommen.

Wie ein Abwasser auf einen Flufs wirkt, läfst sich nur lokal entscheiden mit Rücksicht auf die Nährwerte des Flusses, die Art der Bakterienflora, seine Wasserführung, Geschwindigkeit und Profilform. Besonders dann, wenn es sich um langsam fliefsendes Wasser des Tieflandes, um Seen und Teiche als Vorfluter handelt, ist die vorliegende Frage von besonderer Bedeutung.

Die Flufsverunreinigung kann dann auch andere Formen und einen andern Charakter annehmen. Greift man im Begriff Flufsverunreinigung weiter, so kann man auch die zu starke Entwicklung von Plankton pflanzlicher Natur und die Verkrautung durch höhere Pflanzen hierher rechnen und die Begünstigung der Bildung von Leptomitus lacteus u. dgl. in diese Betrachtung hineinziehen.

Im Hinblick hierauf könnten dann auch Rieselwässer und die Abwässer aus biologischen Kläranstalten Beachtung ver-

dienen, da sie reich an Nitraten und Nitriten und Salzen sind, welche eine günstige Pflanzennahrung geben.

1 cbm Abwasser, gereinigt auf chemischem Wege, bringt noch 994 g Salze pro cbm in den Flufs, 1 cbm biologisch gereinigt (Gr. und L. der Tabelle S. 79) (925,5 g $\times$ 59,5 % Asche) noch 550,6 g.

Bisher fehlte es auch an analytischen Methoden, derartige Verunreinigungen in Flüssen, namentlich bei einigermafsen weitergehende Verdünnungen, aufzufinden. Auch diese Lücke ist heute vollkommen ausgefüllt. In einer der nachfolgenden Arbeiten werde ich zeigen, dafs eine von mir angegebene kolorimetrische N-Bestimmung auch den höchsten Anforderungen entspricht und quantitative Messungen der Flufsverunreinigungen erlaubt, die bisher ausgeschlossen schienen.

Elementaranalytische Bestimmung des Stickstoffs im Wasser.

Von

Max Rubner.

Der in organischer Bindung vorhandene N ist bisher schon mehrfach hinsichtlich seines Vorkommens namentlich dort, wo er sich wie im Grubeninhalt und den sonstigen Ausscheidungen von Mensch und Tier in etwas gröfserer Menge findet, verfolgt worden, teils mit Rücksicht auf seinen Wert als Pflanzennährstoff, teils hinsichtlich der Möglichkeit der Verunreinigungen öffentlicher Wasserläufe.

Als eine hierfür geeignete Methode hat sich die Kjeldahlsche N-Bestimmung erwiesen; obschon gelegentlich auch andere Verfahren wie das von Will-Varrentrapp geeignet sein können.

Anders liegt es mit dem Nachweis des N dort, wo derselbe wie in Flüssen, Bächen, Brunnen in hochgradiger Verdünnung erwartet werden mufs.

Die elementaranalytische Methode von Frankland und Armstrong kann schon wegen der aufserordentlichen Umständlichkeit, die über den Arbeitsaufwand einer N-Bestimmung nach Dumas noch hinausgeht, keinen Anspruch auf allseitige Benutzung erheben und hat solchen auch nicht gefunden.

Am meisten ist noch die Abspaltung von N in der Form von NH_3 durch Erwärmen mit alkalischer Permanganatlösung

empfohlen worden (Wanklyn, Chapmann, Smith), aber sie ist wegen der unvollständigen Spaltung der organischen Verbindungen sehr ungenau und deshalb wohl ganz entbehrlich.

Die Kjeldahlsche Methode gibt eine sichere Bestimmung des Gesamt-N, und Hand in Hand mit einer NH_3-Bestimmung auch den organisch gebundenen N.

Aber gerade sie hat bis jetzt wenig Benutzung erfahren.

Dies kann auffällig gefunden werden, wenn man erwägt, dafs die durch städtische Abgangswässer abgeschwemmten N-Mengen sehr erheblich sind. Berliner Kanalwasser führt im Liter bis 0,223 g N, und da 113 l pro Tag und Kopf entleert werden, so kommen dann in absoluter Menge täglich bis 25,1 g N zur Ableitung aus der Stadt.

Es gehören grofse Wassermengen dazu, solche N-Mengen zu hochgradiger Verdünnung zu bringen. Eine solche wird wohl auch nicht immer in den Flüssen herbeigeführt.

Aber schon mäfsige Verdünnungen machen es unmöglich, die Kjeldahlsche Methode unmittelbar anzuwenden. Wenn man auch schliefslich durch Eindampfen grofser Wassermengen eine analytisch fafsbare Konzentration herstellen kann, so hat eben die Umständlichkeit des Verfahrens, die Kostspieligkeit und der Zeitaufwand alle Untersucher bisher abgeschreckt, auf diesem Wege die Frage der Flufsreinigung zu studieren. Noch weniger aussichtsreich mufste die Analyse von Quell-, Grund- und nicht verunreinigten Flufswässern erscheinen.

Aber vielleicht ist nicht die mühselige Technik der alleinige Grund des Fehlens von Untersuchungsergebnissen, sondern die Anschauung, dafs man die chemische Wasseruntersuchung überhaupt als entbehrlich betrachtet hat. Man hat über die Feststellung der Bakterienzahl oft vergessen über Mittel nachzudenken, den Nährstoff, auf dem die Bakterien wachsen, selbst zu erkennen.

Die »Nährstoffe«, welche man früher durch die Analysen bestimmen wollte, wurden nebensächliche Dinge. Fast ausschliefslich wurde nur mehr in der Analyse auf gewisse Umwandlungsprodukte Rücksicht genommen. Die Feststellung des Vorkommens von N in Grund-, Quell- und Oberflächenwässer befafst sich sozu-

sagen ausschliefslich mit der Bestimmung von NH_3, NO_2H, NO_3H, nicht aber mit der Untersuchung auf organische N-Verbindungen.

Die landläufige Darstellung sieht den N in den Wässern — mit den in der Natur begründeten Ausnahmen im Meteorwasser, und bei tiefliegenden Grundwässern — als Verunreinigung an, ausgehend von menschlichen, tierischen und pflanzlichen Abbaustoffen; sie hat damit unrecht. Denn es ist nicht bewiesen, dafs die N-Verbindungen nicht auch andrer Herkunft sein können.

Man nimmt weiters an, dafs der N der »Abfallstoffe und besonders des Harns« schnellstens in NH_3 oder NO_2H und NO_3H übergeführt werden; aber auch dies ist nicht richtig. Findet man doch im Berliner Sielwasser, das streckenweise im Winter bei —20° noch +15 bis +25° aufweist, wie ich dargetan habe, 90% an organischem N vor. In dieser ganzen Lehre vom Vorkommen des NH_3, der NO_2H, NO_3H liegt Tatsächliches mit sehr reichlichem Hypothetischen gemischt vor und dringend bedürfte es der Scheidung.

Man sollte denken, wenn es der Mühe wert ist, in hunderttausenden von Fällen im Trinkwasser nach Salpetersäure, salpetriger Säure, Ammoniak zu suchen, dann müfste es doch auch notwendig sein, noch die Muttersubstanzen zu bestimmen, aus denen das Ammoniak sich bildet, oder auch nachzuweisen, dafs nur mehr NH_3 vorhanden ist, also der Zerlegungsprozefs zu Ende gekommen sei. Aber a priori ist letzteres doch nicht in allen Fällen vorauszusetzen. Man könnte mir aber, wenn ich sage, man habe bei der Suche nach N-haltigen Stoffen im Wasser die wichtigste Gruppe ganz beiseite gelassen, entgegnen, man habe durch die analytische Feststellung der »organischen Substanz« eines Wassers ein wichtiges Kriterium zur Erkennung von komplizierteren organischen Stoffen angewandt.

Auch das kann man nicht zugeben. Die Bestimmung der organischen Substanz in ihren üblichen Formen der verschiedenen Permanganatmethoden hat einen sehr problematischen Wert und zur Ableitung der sogenannten Faulfähigkeit der Wässer ist sie nur bedingt leistungsfähig.

Wenn aber irgendwo die Frage der Fäulnisfähigkeit in Betracht gezogen werden soll, ja wenn überhaupt nur die Entwicklungsmöglichkeit von Bakterien und anderen kleinsten Lebewesen in Betracht kommt, ist in der überwiegenden Zahl der Fälle organisch gebundener N entscheidender als die »organische Substanz« allein, ohne Kenntnis der vorhandenen N-Menge.

Gewifs ist auch der gebundene N nicht ein universelles Nährmaterial, sondern die Art der chemischen Natur der Substanz entscheidend. Die Abfallstoffe (Sielwasser, Grubeninhalt u. dgl.) enthalten neben höher zu bewertenden Stoffen reichlich solche Körper wie die Aminosäuren, Diaminosäuren, Polypeptide, Extraktivstoffe, die alle mehr oder minder gut zur Ernährung der Mikroorganismen sich eignen.

Ja sie sind nicht nur N-Quellen an sich, sondern wirkliche Nährstoffe, die neben Wachstum bei den Fäulniserregern zum Stoffwechsel selbst zu dienen vermögeu, also den ganzen Hausbalt solchen Organismen bestreiten lassen.

Die Erkenntnis des N-Gehaltes in organischer Bindung mufs uns also, wenn auch nicht ganz präzis, doch schon mit grofser Annäherung einen Aufschlufs über die Wasserbeschaffenheit geben.

Ganz abgesehen von der Wichtigkeit einzelner Verbindungen (ausnahmslos liegen Gemische vor), liegt in der analytischen Feststellung des absoluten Gehaltes einer Flüssigkeit an gebundenem N ein sicherer Anhaltspunkt zur Bewertung des maximalsten Nutzwertes eines Wassers für Mikroorganismen. Die Bakterienernte, welche in einer gegebenen Flüssigkeit erreicht werden kann, ist ganz von der absoluten Konzentration dieser organischen N-Verbindungen abhängig Wenn in einer Lösung eines fäulnisfähigen Gemisches die Ernte 1 erzielt wird, und wir verdünnen mit reinem Wasser auf das 1000fache, so ist auch die maximalste Ernte nur $^1/_{1000}$, d. h. die zu erreichende Bakterienzahl nur $^1/_{1000}$ (meist weniger).

Schon aus den N-Verbindungen kann man im voraus sagen, ob irgendwie Mifsstände sich ergeben können.

Die in der Volumeinheit sich ergebende maximale Ernte steht natürlich in engen Zusammenhang mit der Sauerstoffzehrung. Je kleiner die Ernten, um so leichter tritt der O in das Wasser ein, und um so sicherer kann nur aerobe Zerlegung in Frage kommen. Ein Wasser wird also sicher um so günstiger zu beurteilen sein, je geringer sein organischer N-Gehalt ist.

Ammoniak als Nährstoff kann nur dann vom Standpunkt der Frage bedenklicher Verunreinigung in Betracht kommen, wenn gleichzeitig N-freie Substanzen vorhanden sind. An sich ist NH_3 aufser für die Nitrat- und Nitritbildner als Nährstoff ohne Bedeutung.

Ich glaube, die hier angeführten Gründe werden für den Wert der Bestimmung des organischen N wohl Beachtung verdienen. Der N in organischer Bindung entspricht dem Gesamtstickstoff abzüglich des Ammoniaks, welch letzteres leicht genug festzustellen ist.

Der organische Stickstoff kann in zwei wesentlich verschiedenen Zuständen in die Erscheinung treten — als gelöste Substanz und als Suspendiertes.

Unter letzterem verstehe ich nicht nur das gröbere, durch Papier zu filtrierende Material, sondern auch die feinsten Teilchen, wie die Bakterien.

Bei der grofsen Bedeutung, welche gerade die suspendierten Stoffe mit Hinsicht auf die Flufsverunreinigung haben, nahm ich schon vor mehreren Jahren Gelegenheit, mein Augenmerk auf den N-Gehalt dieser Stoffe zurichten. (Archiv f. Hyg., Bd. XLVI, S. 1.)

Neben der Bestimmung des organischen Stickstoffs im ganzen kann man alle suspendierten Stoffe (nebst kleinen Anteilen von gelösten Kotanteilen) aus dem Wasser gewinnen durch Ausfällung des zu untersuchenden Wassers durch essigsaures Eisen in der Wärme; der Niederschlag läfst sich leicht sammeln und der Kjeldahlbestimmung unterwerfen. Da man ohne Unbequemlichkeit 20 l Wasser für eine Analyse ver-

verwenden kann, hat die Methode einen sehr hohen Grad von Genauigkeit. Sie fällt auch die Bakterien quantitativ.

Sie ist vor allem imstande, auf Flufsverunreinigung durch städtische Abgangswässer angewandt, die Verschleppung der suspendierten Substanz auf weite Wegstrecken zu studieren, und, was uns bis jetzt fehlt, zu zeigen, wie lange das eigentliche Sedimentierungsgebiet ist.

Es kann nach dem Gesagten von Interesse sein, das Vorkommen des N in Wasser also genauer zu verfolgen; ergänzt man die Bestimmung des organischen N, gelöst und suspendiert, noch durch NH_3-Bestimmungen und Bestimmungen der Nitrate und Nitrite, so läfst sich hoffen, einen Schritt in der Beurteilung der Wässer vom hygienischen Standpunkt wieder etwas weiter zu kommen. Freilich werden dazu wohl gröfsere Untersuchungsreihen nötig werden.

Wir erhalten dann fünf besondere Stoffe und Gruppen als tauglich zur Beurteilung:

1. Gelöster N: a) organisch gebunden.
   b) Ammoniak.
   c) NO_3H.
   d) NO_2H.
2. Suspendierter N.

Vorausgesetzt, man erhebt die Bilanz des N in dieser Weise, so darf man sicher erwarten, näheres über die Zerlegungsvorgänge oder über den Reinheitsgrad des Wassers aussagen zu können. Vielleicht lassen sich auch über die noch immer unvollständig bekannten Verhältnisse der Absorption N-haltiger Verbindungen im Boden nähere Aufschlüsse gewinnen. Gerade mit Rücksicht auf letztere hat man den biologischen Vorgängen viel zu wenig Bedeutung zugemessen. Das Bakterienwachstum im Boden z. B. ist durch den Verbrauch N-haltiger Stoffe und deren Umwandlung in Leibessubstanz ein wichtiger Faktor für das Schwinden organischer N-Verbindungen.

Das wichtigste ist zunächst die Frage, ob es möglich ist, die Bestimmung des Gesamt-N in allen Wässern auszuführen.

Die Grenze liegt einmal in der Schärfe der Titrierung und unvermeidlichen Fehlern der Kjeldahlschen Methode überhaupt, die mehrere Zehntel Milligramm zum allermindesten ausmachen. Wenn man den mittleren N-Gehalt eines Sielwassers zu 0,1 g N pro l annimmt, so könnte schon eine erhebliche Verdünnung vorhanden sein, um die Grenzen der Methode zu erreichen, falls man nicht zu kleine Flüssigkeitsmengen anwendet. Wie es aber mit reineren Wässern steht, war nicht vorauszusehen.

Ich habe mich daher mit orientierenden Analysen beschäftigt, um über die tatsächlichen N-Werte ins klare zu kommen. Von Trinkwässern wurden je 20 l unter etwas Säurezusatz für die N-Bestimmung eingedampft; in anderen Fällen reicht man mit weniger Wasser sehr gut aus.

Mehrfach wurde neben N in der einfach eingedampften Wasserprobe nach Verjagung der Karbonatkohlensäure auch der C elementaranalytisch bestimmt, um zu erfahren, in welchen Relationen dieses Element zum N steht.

Einen wesentlichen Teil der Analysen hat Herr Dr. Brunner damals Assistent an meinem Institut ausgeführt. In die Tabelle habe ich noch Zahlen eingetragen, die ich früher im Mittel für den N-Gehalt der suspendierten Substanz und für die Verbrennungswärmen dieser Stoffe erhalten hatte. (Archiv für Hyg. Bd. XLVI, S. 33.)

In nachstehender Tabelle habe ich die Analysen pro Liter zusammengestellt.

	Leitungswasser	Spreewasser	Kanalwasser	Torfwasser †)
Trockenrückstand	247	—	920,0 *)	1514 †)
Organ. Kohlenstoff	5,58	—	157,3 *)	692,6 †)
Gesamtstickstoff	0,46	2,13	65,33 *)	7,64 †)
Suspend. Stickstoff	(0,03)	(0,56)	(23,39)	—
g-Kal.	(10,3)	(44,5)	(2091,3)	(1459,2) †)

*) Wasser vorher filtriert.

†) Vorher filtriert.

Das Berliner Leitungswasser, ein filtriertes Seewasser, lieferte pro l nur 0,46 mg Gesamtstickstoff; es enthielt kein NH_3 und keine Nitrate und Nitrite. Der C-Gehalt ist über zehnmal so grofs wie der N-Gehalt. Der letztere ist zu gering, als dafs man bei Verwendung kleiner Wassermengen ihn auffinden könnte.

Trotz der Filtration findet man doch noch etwas mit Eisen fällbare Substanz. Letztere könnte ja auch etwas von Huminsubstanzen beeinflufst sein, aber es ist unschwer zu zeigen, dafs — abgesehen vom bakteriologischen Befund — das Wasser sich nicht als optisch rein erweist.

Läfst man den Strahlenkegel der elektrischen Lampe im verdunkelten Zimmer in das Wasser fallen, so zeigte sich deutlich der blaue Lichtkegel.

Was ich früher an suspendiertem N gefunden hatte, ist viel weniger als der Gesamt-N. Jedenfalls sind also gelöste N-haltige organische Stoffe im Wasser vorhanden. Auch solche Körper mögen manchmal aus Moorlagern herrühren, wenigstens enthält der konzentrierte Moorextrakt aus Torfmull reichlich N. (Siehe Tabelle.) Aber diese Substanz kann selten störend sein, wie ja die Farbe des Wassers schon darüber Auskunft gibt, ob solches vorliegt, weil bei Verdünnungen, die das Hundertfache meines künstlichen Extraktes ausmachen mögen, aber deutlich gelb sind, die Bedeutung des N-Gehaltes aus Moorsubstanzen ganz zurückgedrängt wird.

Die Moorsubstanz hat auch noch die sehr charakteristische Eigenschaft des hohen Gehalts an N-freien Stoffen organischer Natur, der sich in hohem C-Gehalt ausprägt.

	$\frac{C}{N}$
Leitungswasser	12,1
Moorwasser	90,7.

Auch für Spreewasser erkennt man eine erhebliche Mehrung des gelösten N und ähnlich für das Kanalwasser. Die gesamte Menge des organisch gebundenen N prägt sich demnach recht wohl als charakteristisches Merkmal eines Wassers aus und pafst sehr gut zur Vervollständigung der Analysen über die suspen-

dierte Materie, für welche ich schon früher die N-Bestimmung neben Feststellung der Verbrennungswärme der Stoffe empfohlen habe.

Die methodisch durchgeführte Bestimmung des N in den Wässern erscheint demnach aussichtsreich.

Ich gebe aber gerne zu, dafs wenigstens für an sich reinere Wässer, wie sie getrunken werden, die Kjeldahlsche Methode, so wie sie ist, sich nicht einbürgern kann.

20 l abzudampfen und ohne Verlust zu arbeiten, ist zu umständlich. Nur dann, wenn man mit Rücksicht auf einzelne Fragen dazu gezwungen ist, läfst sich die Arbeitslast rechtfertigen, die Beschränkung auf enge Kreise der Analyse ergibt sich aber von selbst.

Ich habe mich deshalb bemüht, eine Verbesserung der N-Elementaranalyse zu erreichen, welche die Anwendung von relativ kleinen Wassermengen erlaubt. Dies ist mir durch die Umgestaltung der Kjeldahlschen Methode in eine kolorimetrische Methode gelungen. Eine Reihe von mir ausgeführter Vorversuche verlief so günstig, dafs ich diese Methode durch Herrn Korschun näher auf ihre praktische Durchführung untersuchen liefs.

Ich glaube, man wird die N-Bestimmung des Wassers nicht gerne missen; die kolorimetrische Methode ist aber auch für viele andere Zwecke, wo es sich um minimales Vorkommen des N handelt, mit Vorteil anzuwenden.

Näheres bringt die nachfolgende Abhandlung. Kolorimetrisch kann man nach Poleck noch 0,0005 mg NH_3 bei Verwendung in 100 ccm Kolorimeterflüssigkeit noch scharf bestimmen, so weit geht freilich die Genauigkeit bei der Ausführung der N-Bestimmung nach meinem Verfahren nicht, da man ja mit andern Versuchsfehlern als der kolorimetrischen Ablesung zu rechnen hat. Aber sie erlaubt Aufgaben, die bisher nicht angreifbar waren, sicher zu lösen; auch eine vieltausendfache Verdünnung N-haltiger Abfallstoffe kann auf diesem Wege mit Sicherheit festgestellt werden.

Über eine Methode zur Bestimmung geringer Stickstoffmengen und die Verwendung dieser Methode für die Untersuchung der Verunreinigung des Wassers durch organische Substanzen.

Von

Dr. S. Korschun.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. M. Rubner.)

Von den das Wasser verunreinigenden Stoffen sind diejenigen organischen Substanzen, welche von den menschlichen oder überhaupt tierischen Abfällen (Harn, Kot) herrühren, von besonderer Bedeutung. Sie gelangen in das Wasser entweder durch den Boden (Grundwasser) oder unmittelbar, z. B. mit den Kanalwässern. Im ersten Falle werden die organischen Substanzen durch den Boden filtriert, wo sie gleichzeitig verschiedenen biologischen Prozessen, die ihre Zersetzung begünstigen, unterworfen werden. Man findet daher im Brunnenwasser vielfach Ammoniak, salpetrige — und Salpetersäure. Man hat bisher die Frage, ob nicht auch organische Stoffe N-haltiger Natur die tieferen Bodenwässer erreichen niemals einer genauen Untersuchung unterzogen und doch kann man nicht von vornherein die Durchgängigkeit des Bodens für Körper komplizierter Zusammensetzung in Abrede stellen.

Bei der Verunreinigung der Flüsse gelangen die organischen Stoffe in diese meist in demselben Zustande, in welchem sie den

tierischen Organismus verlassen. Allmählich unter dem Einflusse verschiedener Faktoren werden die organischen Substanzen im Flufswasser einer endgültigen Oxydation unterworfen und die Flüsse von der Verunreinigung befreit. Die Hauptaufgabe der Untersuchung läge hier in dem Nachweis der Anwesenheit von organischen Substanzen, sowohl in Form von im Wasser löslichen Verbindungen, als auch in Form von unlöslichen, suspendierten Stoffen, dieser charakteristischen Elemente der tierischen Abfälle.

In dem Falle, dafs die Abwässer, ehe sie den Flufs erreichen, einer chemischen Bearbeitung zum Zwecke ihrer Befreiung von suspendierten Partikeln unterworfen werden, ist ihr Gehalt an organischen Substanzen noch immer bedeutend.

In all diesen Fällen, welche ich als Beispiele gewählt habe, liegt die Notwendigkeit vor, den N, soweit er in organischer Bindung vorhanden ist, näher festzustellen. Die Bedeutung, welche der exakte Nachweis organisch gebundenen Stickstoffs haben kann, ist durch Prof. Rubner in der vorhergehenden Abhandlung näher geschildert worden, so dafs ich darauf verzichten kann, näher auf den Wert einer solchen Methodik für die Hygiene einzugehen.

Leider besafsen bis jetzt die Hygieniker keine Methode, welche mit genügender Genauigkeit und doch auch Bequemlichkeit eine N-Bestimmung gestattet hätte. Die an sich vorzügliche Kjeldahlsche Methode macht es notwendig, grofse Wassermengen (bis 20 l) erst zu konzentrieren, ehe man die in Quellen und Trinkwässern vorkommenden Mengen von gebundenem N quantitativ messen kann. Nur auf solche Fälle, mäfsiger Verdünnung, wo die Verunreinigung noch gerade zulässig ist, wo also noch keine Fäulnis und andere unangenehme Erscheinungen eingetreten sind, war sie anwendbar.

Aus dem vorangegangenen ist zu ersehen, wie wichtig es war, eine Methode zu finden, die die Bestimmung derjenigen, verhältnismäfsig geringen Stickstoffmengen, die gewöhnlich in

den verschiedenen Gewässern enthalten sind, gestattet und mit genügender Genauigkeit ihre Schwankungen feststellt.[1])

Beschreibung der Methode.

Das Prinzip der Methode ist folgendes: Durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumsulfat wird der gesamte Stickstoff in Ammoniak übergeführt und das letztere sodann kolorimetrisch nach Frankland und Armstrong bestimmt. Zur Verbrennung haben wir Kolben nach dem Muster der Kjeldahlschen anfertigen lassen. Dieselben sind kleiner, so dafs ihr kugeliger Teil 50—60 ccm Flüssigkeit fafst. Bei der Kjeldahlschen Bestimmung stören bis zu einem gewissen Grade die Nitrate und Nitrite. Proskauer und Zülzer haben vorgeschlagen, wenn der Salpetergehalt 500 mg pro l nicht überschreitet (Zeitschr. f. Hyg. Bd. VII, 1889, S. 216), das Wasser vorher durch naszierenden Wasserstoff von der Nitroverbindungen des N zu befreien. Walter (Walter und Gärtner in Tieman-Gärtners Handbuch, Die Untersuchung und Beurteilung von Wasser 1895, S. 257) empfiehlt dagegen die Anwendung von SO_2 zur Entfernung der Nitrate[2]).

In meinen Versuchen wurde das zu untersuchende Wasser in schwefelsaurer Lösung bis fast zur Trockne verdampft, Bedingungen, unter welchen der gröfste Teil der stickstoffhaltigen Säuren entweicht.

Sind jedoch gröfsere Mengen von Salpeter- bzw. salpetriger Säure vorhanden, so wird es sich empfehlen, durch Reduktion dieselben in Ammoniak überzuführen und durch eine besondere Bestimmung derselben, etwa mittels Indigolösung, eine entsprechende Korrektion am Gesamtstickstoff anzubringen. Ist die Ver-

1) Ich habe daher auf Veranlassung des Herrn Geh.-Rats Professor Dr. M. Rubner versucht, eine diesen Zwecken entsprechende Methode auszuarbeiten, und zwar durch Überführung des Stickstoffs in Ammoniak und kolorimetrische Bestimmung des letzteren, nachdem Geheimrat Rubner bereits durch Vorversuche sich von der Ausführbarkeit der Methode überzeugt hatte.

2) Rubner, Chemische und biologische Klärung der Abwässer. Diese Zeitschr., Bd. XLII, S. 152.

brennung vollendet, so schreitet man nach entsprechender Verdünnung zur N-H_3 Bestimmung auf kolorimetrischem Wege.

Bei unseren Versuchen bereiteten wir eine Stammlösung von Ammoniumchlorid, die 0,1 g Ammoniak im Liter oder 0,1 mg in 1 ccm enthielt. Aus dieser Lösung wurden die nötigen Verdünnungen hergestellt.

Da das destillierte Wasser des Laboratoriums nicht vollständig ammoniakfrei war, so wurde dasselbe durch Destillation mit Ätzalkali von Ammoniak vollständig befreit.

Zur quantitativen Bestimmung des Ammoniaks benutzten wir zwei Hehnersche Zylinder. Die Höhe der Flüssigkeitssäule bis zur oberen Teilung, sowie der Durchmesser waren für beide Zylinder vollständig gleich. Auch die Genauigkeit der Einteilung in Kubikzentimeter wurde streng kontrolliert. Bei der Bestimmung des Ammoniaks nach der Methode von Frankland und Armstrong mufs zunächst festgestellt werden, bei welcher Intensität der Farbe der Vergleichsflüssigkeit die genauesten Resultate erzielt werden können. Zu diesem Zwecke verfuhren wir folgenderweise:

In einen Zylinder von 100 ccm des Kolorimeters wurde mittels einer präzisen Pipette eine bestimmte Menge der ammoniakalischen Stammlösung (siehe oben) gebracht, z. B. 0,5 ccm — 0,75 ccm — 1,0 ccm — 1,5 ccm — u. s. w., was 0,05 — 0,075 — 0,1 — 0,15 mg Ammoniak entspricht. In den zweiten Zylinder wurde eine $1\frac{1}{2}$ bis 2—3fache usw. Menge derselben Stammlösung abgemessen. Jetzt wurden in jeden Zylinder je 2 ccm des Nefslerschen Reagens zugesetzt, worauf beide Zylinder mit ammoniakfreiem Wasser bis zur oberen Teilung gefüllt wurden. Nach 15—20 Minuten wurde aus dem Zylinder, der mehr Ammoniak enthielt, so viel Flüssigkeit herausgelassen, bis die Intensität der Farbe in beiden Zylindern vollständig gleich erschien.

Diese Versuche zeigten, dafs die Menge des Ammoniaks in 100 ccm 0,6 mg nicht übersteigen darf, da bei gröfserem Gehalt desselben beim Zusatz des Nefslerschen Reagens eine Trübung entsteht, welche den Charakter der Farbe verändert und die Ausgleichung der Farben in beiden Zylindern verhindert. Ander-

seits entsteht bei einem Gehalt von weniger als 0,05 mg Ammoniak beim Zusatz des Nefslerschen Reagens eine zu schwache Färbung, was wiederum die Genauigkeit der Resultate beeinträchtigt. Grofse Verdünnungen sind unerwünscht auch aus dem Grunde, da die Fehler der Bestimmung bei Multiplikation entsprechend vergröfsert werden. Es zeigte sich also, dafs die genannten Resultate erreicht werden können bei einem Gehalt von 0,1—0,2—0,25 mg N-H_3 im Vergleichszylinder.

Man kann ja schliefslich noch weiter in der Verdünnung gehen. So gibt z. B. Poleck, (Kolorimetrie v. G. und H. Krüfs 1891, S. 46) an, dafs beim Vergleich von Normallösungen, welche 0,1 und 0,01 mg N-H_3 in 100 ccm enthielten, mit ammoniakalischen Destillaten noch 2 % oder selbst 1 % der Vergleichslösung herausgefunden werden können.

Nach diesen vorläufigen Untersuchungen unternahmen wir eine Stickstoffbestimmung in frischer käuflicher Hefe. Dieselbe erschien uns besonders geeignet zur Prüfung der Brauchbarkeit unserer Methode, weil lebende Zellen Stickstoff in den verschiedensten Bindungsformen enthalten.

Die Bestimmung des Stickstoffs in käuflicher Hefe. Die Versuche wurden folgenderweise angestellt: Auf einer genauen chemischen Wage wurden schnell 1—2 g Hefe abgewogen und sofort eine feine Aufschwemmung in destilliertem ammoniakfreiem Wasser hergestellt. Die Aufschwemmung wurde in einen 100 ccm fassenden Mefskolben gebracht und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Nachdem die Flüssigkeit sorgfältig durchgeschüttelt war, wurde in zwei Verbrennungskölbchen je 1 ccm gebracht. Die Aufschwemmung wurde jedesmal energisch geschüttelt, damit die Verteilung der Hefezellen eine möglichst gleichmäfsige bliebe. Jedes Verbrennungskölbchen wurde alsdann mit je 3—4 ccm chemisch reiner konzentrierter Schwefelsäure und je 1 g Kalisulfat beschickt. Der Inhalt der Kölbchen wurde jetzt über einem Bunsenbrenner zunächst mit schwacher, alsdann mit voller Flamme erhitzt. Das Sieden wurde so lange fortgesetzt, bis die Flüssigkeit vollständig farblos wurde. Nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit in einen 100 ccm fassenden Mefskolben ausge-

gossen, der Verbrennungskolben einigemal mit Wasser ausgespült und das Spülwasser ebenfalls in den Meſskolben gebracht. Durch Zusatz einer 15—30 proz. Natronlauge wurde die Flüssigkeit alkalisch gemacht und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Es soll eine stärkere Erhitzung der Flüssigkeit vermieden werden, was durch Zusatz der Lauge in kleinen Portionen und durch zeitweise Abkühlung des Kölbchens im Wasserleitungsstrahl erreicht wird. Wenn sich in der Flüssigkeit ein Niederschlag bildet, so wird dieselbe filtriert, und die Ammoniakbestimmung wird mit dem Filtrat nach der oben beschriebenen Methode ausgeführt. Der Stickstoff wird aus dem Ammoniakgehalt berechnet. Aus den vorangegangenen Ausführungen über den Einfluſs der Intensität der Farbe der Vergleichsflüssigkeit auf die Genauigkeit der Resultate ist zu ersehen, daſs man zunächst feststellen muſs, bei welcher Menge der zu untersuchenden Lösung, nach Zusatz des Neſslerschen Reagens, eine Färbung entsteht, die annähernd einem Gehalte von 0,1—0,25 ccm Ammoniak in 100 ccm entspricht. Auſserdem ist dafür zu sorgen, daſs die Flüssigkeit in beiden Zylindern im Verlaufe der Versuche vollständig klar bleibt, und daſs der Unterschied der Farben in beiden Zylindern nicht zu groſs ist. Die Erfüllung der letzteren Bedingung ist notwendig, damit nach der Ausgleichung der Farbe kein zu groſser Unterschied der Flüssigkeitshöhe in beiden Zylindern entstehe. Die Tab. 1 (S. 98) erläutert die betreffenden Versuche.

Die Genauigkeitsgrenze der Methode hängt in erster Linie von der Genauigkeitsgrenze der angewandten kolorimetrischen Methode ab, auſserdem aber sind auch durch die zahlreichen Manipulationen, der Verbrennung, Verdunstung usw. selbst gewisse Grenzen gezogen.

Bei einer Vergleichslösung von 0,05 mg NH_3 lag bei einer Gesamthöhe der Flüssigkeitsschicht von 150 mm, die Unterschiedsschwelle für den Verfasser bei 7,5 mm, entsprechend 5% der Gesamthöhe. Der mögliche Ablesungsfehler betrug also im günstigsten Falle, d. h. bei einem Verhältnis der Schichthöhen von 100 : 100, 0,00265 mg NH_3, bei einem Verhältnis von 100 : 90, 0,00327 mg N oder ca. 0,003 mg N.

Hauptsächlich zwei Fehlerquellen rühren von der chemischen Methode her. Infolge der Neutralisation der Schwefelsäure befinden sich grofse Mengen von Salzen im Reaktionsgemisch, und diese verhindern es, mehr als 40 ccm desselben bei der kolorimetrischen Bestimmung zur Anwendung zu bringen, da sonst leicht Niederschläge sich bilden. Der mögliche Fehler wird hierdurch auf das $2^1/_2$fache erhöht.

Tabelle 1.

Angewandte Hefe in g	Stickstoff in mg			Stickstoff in Prozenten der Hefe			
	Berechnet aus dem Mittelwert	Gefunden	Fehler	nach der neuen Methode		nach Kjeldahl	
I. 0,01	0,265	0,26	— 0,005	2,60	2,65	2,59	2,55
0,02	0,530	0,54	+ 0,010	2,70		2,51	
II. 0,01	0,223	0,214	— 0,009	2,14		2,28	
0,02	0,446	0,478	+ 0,032	2,39			
0,0221	0,493	0,490	— 0,003	2,22	2,23		
0,0221	0,493	0,515	+ 0,022	2,33			
0,0442	0,986	0,930	— 0,056	2,10			
0,0442	0,986	0,970	— 0,016	2,19			
III. 0,0161	0,356	0,367	+ 0,011	2,28		2,22	2,23
0,02068	0,457	0,450	— 0,007	2,18		2,24	
0,02068	0,457	0,455	— 0,002	2,18	2,21		
0,0322	0,712	0,730	+ 0,018	2,28			
0,04137	0,914	0,878	— 0,036	2,12			
0,04137	0,914	0,924	+ 0,010	2,24			
IV. 0,02168	0,518	0,512	— 0,006	2,36		2,34	
0,02168	0,518	0,540	+ 0,022	2,49	2,39	2,32	2,33
0,04336	1,036	1,060	+ 0,024	2,45		2,32	
0,04336	1,036	0,995	— 0,041	2,28			

Da sich zur kolorimetrischen Bestimmung ein Gehalt von mehr als 0,25 mg NH_3 nicht eignet, so mufs die Reaktionslösung bei einem Gehalt von mehr als 0,625 g NH_3 entsprechend verdünnt werden, die Fehler werden entsprechend bei der Umrechnung vergröfsert. Dieser letzte Umstand fällt besonders schwer bei der Wasseranalyse ins Gewicht.

Wo eine derartige Verdünnung nicht erforderlich war, konnte eine Abweichung von mehr als 0,03 mg N vom Mittelwerte nicht beobachtet werden.

Die Durchschnittszahlen aus einer Reihe von Stickstoffbestimmungen nach der kolorimetrischen Methode stimmen also gut mit denen, die nach der Kjeldahlschen Methode gewonnen sind, überein. Die Differenz schwankt (relativ) in einzelnen Analysen zwischen 0,9—4%. Natürlich kann man noch kleinere NH_3-Mengen als in den Verbrennungen mit Hefe auffinden, aber die Genauigkeit der Resultate in Prozenten der Abweichungen ausgedrückt, wird dann kleiner.

Die Bestimmung der Stickstoffmenge im Wasser.

Bei der Bestimmung der Verunreinigung des Wassers sowie bei der Beurteilung des Selbstreinigungsprozesses der Flüsse ist nicht nur die Kenntnis des Gesamtgehaltes an Stickstoff von grofsem Wert, sondern auch die Feststellung, in welcher Form der Stickstoff im Wasser enthalten ist. Bei der Analyse ist deswegen zu bestimmen:

1. Die Menge des Ammoniaks, der salpetrigen und Salpetersäure;
2. die Menge des Stickstoffes in den gelösten organischen Verbindungen und
3. die Menge des Stickstoffes in den ungelösten suspendierten Stoffen.

Es fragt sich nun, bei welcher Verdünnung des Inhaltes der Senkgruben und des Harns eine genügend genaue Bestimmung ihres Gehaltes in Flufs- und anderen Wasserarten mittels der kolorimetrischen Methode noch zu erzielen ist. Wie unsere Versuche mit Hefe zeigten (siehe Tabelle Nr. 1), ist eine quantitative Bestimmung von 0,21—0,26 mg noch gut möglich, wobei der Fehler bei einzelnen Bestimmungen mit der zweiten Dezimale ausgedrückt wird und 0,03—0,05 mg nicht übersteigt.

Der Inhalt der Senkgruben enthält durchschnittlich 0,7 % Stickstoff oder 7 g im Liter, also bei einer 35000fachen Verdünnung wird der Stickstoffgehalt 0,2 mg im Liter betragen. Er ist dann noch sicher und genau zu bestimmen.

Der Harn enthält 1,2 % Stickstoff oder 12 g im Liter, bei einer 50000fachen Verdünnung würde der Stickstoffgehalt erst 0,2 mg betragen. Man kann natürlich mit der Verdünnung noch weiter gehen. Wir können also die Verunreinigung der Abwässer durch die genannten Substanzen bei einer Verdünnung von 35000—50000 noch feststellen. Die Empfindlichkeit unserer Methode ist also viel gröſser als die der andern, bisher angewandten chemischen Untersuchungsverfahren.

Methodik. Ein genau abgemessenes Wasserquantum (200—1000 ccm) wird nach Zusatz von 2—3 ccm verdünnter Schwefelsäure auf einem Wasserbade bis 20 ccm eingedampft und alsdann sorgfältig in einen Verbrennungskolben übergeführt.

Nach Zusatz von 5—8 ccm konzentrierter Schwefelsäure und ca. 1 g schwefelsaurem Kali wird die Verbrennung der organischen Substanzen, wie oben beschrieben, vollzogen. Zuweilen, bei einem groſsen Salzgehalt der Flüssigkeit, siedet dieselbe unter heftigem Aufstoſsen, wobei ein Teil der Flüssigkeit leicht verloren gehen kann. Um diese Gefahr zu vermeiden und ein gleichmäſsiges Kochen zu erreichen, genügt es, in den Kolben ein wenig Talk zuzusetzen. Die Anwesenheit dieser Substanz verhindert nicht die Erkennung der Endreaktion, da beim Aufhören des Siedens der Talk schnell zu Boden sinkt. Die vollständige Entfärbung der Flüssigkeit wird als Zeichen der vollendeten Verbrennung angesehen.

Während des Kochens ist darauf zu achten, daſs im Kolben eine genügende Menge Flüssigkeit enthalten ist, widrigenfalls werden die Ammoniaksalze unter Verlust von Ammoniak zersetzt. Ist die Verbrennung beendet, so wird der Inhalt in einen 200 oder 250 ccm fassenden Meſskolben gebracht, mit einer geringen Menge Wasser verdünnt, mit 15—30 % Natriumhydratlösung neutralisiert und auſserdem noch ein Überschuſs der-

selben Lösung bis zur deutlich alkalischen Reaktion zugesetzt. Man fügt dann noch einige Kubikzentimeter einer 15 proz. Sodalösung hinzu, füllt den Kolben bis zur Marke mit Wasser und läfst nach tüchtiger Durchschüttelung 15—20 Minuten stehen. Das sich ausscheidende Sediment wird abfiltriert und die Stickstoffbestimmung im klaren Filtrate geschieht in der oben beschriebenen Weise.

Für jede Wasserprobe werden mindestens zwei Analysen ausgeführt.

Die Bestimmung der Stickstoffmengen in im Wasser suspendierten Stoffen.

Prof. Rubner hat eine sehr bequeme Methode zur Ausfällung der im Wasser suspendierten Partikeln vorgeschlagen. Zu diesem Zwecke wird zu einem grofsen Wasservolumen (5 bis 10 l) eine frisch bereitete Lösung von essigsaurem Eisen zugesetzt und die Flüssigkeit eine Stunde lang im Dampftopf erhitzt. Bei neutraler Reaktion scheidet sich dabei basisches Ferriazetat ab, welches beim Absetzen alle suspendierten Partikeln mitreifst. Das essigsaure Eisen wird jedesmal unmittelbar vor dem Gebrauch bereitet. Für 10 l Wasser ist nach Rubner[1]) 80 ccm eines Gemisches aus gleichen Teilen 8 proz. Eisenchloridlösung und einer äquivalenten Menge von essigsaurem Natron genügend.

Wir bearbeiteten 4—5 l Wasser mit essigsaurem Eisen und entfernten nach vollständigem Absetzen des Niederschlages den gröfsten Teil der klaren Flüssigkeit mit Hilfe eines Hebers. Die zurückgebliebene Flüssigkeit, zusammen mit dem Sediment, zentrifugierten wir ab und gossen die klare Flüssigkeit nochmals möglichst vollständig vom Sediment ab. Das Sediment sammelten wir alsdann auf einem kleinen Filter; dasselbe wurde zusammen mit dem Sediment in einen Verbrennungskolben übertragen und nach Zusatz von 8—10 ccm konzentrierter Schwefelsäure und

1) Arch. f. Hygiene, Bd. XLVI, S. 31.

1 g schwefelsaurem Kali erhitzt. Das Erhitzen wurde bis zur vollständigen Entfärbung fortgesetzt. Das Verbrennen vollzieht sich sehr langsam und erfordert zuweilen sechs und mehr Stunden. In solchen Fällen ist es notwendig, ein- oder zweimal je 4 ccm Schwefelsäure zuzusetzen. Nach Beendigung der Verbrennung wird der Kolbeninhalt wie bei der Bestimmung der Gesamtmenge des Stickstoffes im Wasser weiter behandelt. Das Eisen fällt dabei in Form eines reichlichen rotgrauen Niederschlags aus. Von der, auf diese Weise festgestellten Stickstoffmenge wird der Stickstoffgehalt des Filters, welcher vorher bestimmt werden mufs, abgezogen.

Die Bakterien gehen quantitativ in die Eisenfällung über. Da man recht gut Wassermengen bis zu 20 l zur Analyse der suspendierten Teile benutzen kann, so kann man eine Schätzung darüber anstellen, ob und inwieweit man bei bakteriellen Verunreinigungen die letzteren in der Analyse zum Ausdruck kommen lassen kann. Nach Rubner entspricht 0,1 mg N 34500000000 Individuen von bact. proteus vulg. 0,03 mg N lassen sich sehr wohl durch diese neue N-Bestimmungs-Methode auffinden. = 1035000000 Bakterien.

Bei 20 l Wasser trifft auf 1 l 56700000 Bakterien, auf 1 ccm 56700 Keime.

Dieser Zuwachs wäre also bestimmt nachzuweisen, darunter erhält man auch noch Ausschläge, aber sie sind mit weniger Genauigkeit festzustellen. Daraus folgt, dafs wie mit der chemischen Methode bereits sehr nahe an die Bestimmungsgrenze mäfsiger Bakterienzahlen herankommen, wenn man berücksichtigt, dafs Poleck noch 0,002 und 0,001 NH_3, ja 0,0005 für mefsbar hält. Nehmen wir auch nur 0,001 g **N** (nicht NH_3) als Grenze, so wäre dies $^1/_{30}$ der obigen Bakterienzahl also pro 1 ccm

$$= 1890,$$

was einem mäfsigen Gehalt von Brunnenwasser entspricht. Vorläufig stehen aber noch einige Schwierigkeiten der technischen Durchführung solch diffiziler Versuche entgegen.

Nachstehend habe ich meine Resultate tabellarisch zusammengestellt.

Tabelle 2.

Woher ist das Wasser entnommen?	Der Stickstoffgehalt in 1 l des Wassers		
	Gesamtmenge	in Form von NH_3	in suspendiert. Stoffen
I. Berlin. Leitungswasser	0,58 mg	nicht bestimmbar	0,108 mg
	0,59 »		0,104 »
II. Berlin. Leitungswasser	0,53 »		—
	0,56 »		—
III. Charlottenburg. Leitungswasser.	0,51 »	—	0,100 »
	0,54 »	—	—
IV. Spreewasser 1. in Berlin . .	2,10 »	1,04 mg	0,4 »
	2,11 »	—	—
	2,16 »	—	—
2. in Charlottenburg . . .	1,88 »	0,77 »	0,44 »
	1,88 »		0,446 »
	1,87 »		
	1,92 »		
V. Pankewasser (währ. d. starken Frostes) . . .	2,55 »	1,44 »	0,474 »
	2,56 »		
VI. Pankewasser (Hochwasser) .	11,76 »	6,42 »	2,11 »
	11,10 »		
VII. Brunnenwasser in Berlin . . .	0,96 »	0,95 »	0,03 »
	0,94 »		
VIII. Brunnenwasser in Spandau . .	5,8 »	5,6 »	0,086 »
	6,0 »		0,087 »

Aus diesen Grundzahlen läſst sich dann betreffs des Vorkommens von organisch gebundenem Stickstoff nähere Auskunft geben.

Tabelle 3.

Milligramm im Liter.

	Organisch geb. Stickstoff	NH_3 präformiert	Suspendierter Stickstoff	Stickstoff in Summe
Leitungswasser von Berlin	0,45	0	0,108	0,560
Leitungswasser von Charlottenburg	0,41	0	0,100	0,510
Brunnenwasser von Berlin	0	0,950	0,08	0,98
Brunnenwasser von Spandau	0,12	5,60	0,08	5,90
Spreewasser (oberhalb Berlin)	0,68	1,04	0,400	2,12
Spreewasser von Charlottenburg	0,65	0,77	0,440	1,86
Panke (niedriger Wasserstand)	0,61	1,44	0,47	2,55
Panke (Hochwasser) . .	2,90	6,42	2,11	11,43

Diese Versuche wurden zu dem Zwecke vorgenommen, um festzustellen, in wie weit unsere Methode zur Untersuchung verschiedener Wasserarten verwendbar ist. Sie sind daher nicht so weit vollständig und systematisch durchgeführt, daſs man aus ihnen einen Schluſs über den Einfluſs der Stadt Berlin auf die Verunreinigung seiner Flüsse ziehen könnte. Es muſs noch bemerkt werden, daſs fast alle Untersuchungen während der starken Winterfröste, als die Flüsse Spree und Planke mit Eis bedeckt waren, ausgeführt wurden. Auſserdem ist zu erwähnen, daſs das Wasser aus der Planke am Montag um 8 Uhr des Morgens entnommen wurde, d. h. zu einer Zeit, wo der gröſste Teil der längs dieses Flusses liegenden Fabriken im Laufe von 24 Stunden vorher nicht gearbeitet hatte. Einmal wurde das Wasser der Panke während des Frühlingstauwetters bei hohem Wasserstande untersucht (Versuch 5).

Aus diesen Versuchen können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Bei kleinstem Stickstoffgehalte im Wasser (0,5 bis 2,56 mg im Liter) ist der Fehler unserer Methode nicht gröfser als 0,02—0,05 mg.
2. Das Berliner Leitungswasser enthält 0,55—0,6 mg Stickstoff im Liter, Charlottenburger etwas weniger: 0,51 bis 0,54 mg. Der Stickstoffgehalt der suspendierten Partikeln ist in beiden annähernd gleich und beträgt 0,1 mg im Liter.
3. Die Analysen des Wassers der Flüsse Spree und Panke ergaben einen vier- bis fünfmal gröfseren Gesamtstickstoffgehalt als das Leitungswasser, wobei der gröfste Teil des Stickstoffes in Form von Ammoniak und ungelöster suspendierter Stoffe sich befindet. Während des Hochwassers stieg der Stickstoffgehalt der Panke von 2,55 bis 11,7 mg im Liter. Dabei war auch eine relativ starke Vermehrung des Stickstoffes in Form von organischen Verbindungen festzustellen.
4. Im Brunnenwasser ist der Stickstoff fast ausschliefslich in Form von Ammoniak enthalten; während sein Gehalt in Form von suspendierten Partikeln so gering ist, dafs er die Fehlergrenzen der Methode fast erreicht. Das bezieht sich besonders auf das Wasser, das einem Brunnen in Berlin entnommen wurde, wo die Kanalisation schon längst existiert, und wo folglich der Boden nicht so verunreinigt ist wie in der alten Stadt Spandau, deren Kanalisation erst ziemlich kurze Zeit existiert.

Wenn wir zusammenfassend die Resultate unserer Untersuchungen formulieren, so ergibt sich, dafs unsere Methode zur Bestimmung solcher geringen Mengen von organischen Substanzen, die früher nicht bestimmt werden konnten, vollständig brauchbar ist. Sie kann daher die Lücke, die in der hygienischen Methodik bei der Untersuchung der Verunreinigung der Flüsse

und der Prozesse ihrer Selbstreinigung sich fühlbar machte, mit Erfolg ausfüllen. Außerdem wird diese Methode auch bei anderen Untersuchungen sicherlich Verwendung finden.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Rubner für die Anregung zu vorliegender Arbeit und Herrn Dr. Nawiasky für die Unterstützung bei Ausführung derselben meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Untersuchungen über die Wachstumsgeschwindigkeit der Typhusbazillen in Galle.

Von

Dr. W. Pies.

(Aus dem hygienisch-bakteriologischen Institut zu Strafsburg i. Els.)

Schon seit längerem ist es bekannt, dafs beim Typhus abdominalis die Krankheitserreger meist zahlreich und in Reinkultur in der Gallenblase gefunden werden, und dafs sie dort noch monate-, ja jahrelang nach überstandener Krankheit sich erhalten und vermehren können (vgl. hierüber: Forster und Kayser [1]). Dies ist um so auffallender, als es nur verhältnismäfsig selten gelungen ist, das Bacterium coli in der Galle aufzufinden, obwohl dies im allgemeinen geringere Ansprüche an seine Nährböden stellt als das Bacterium typhi.

Dies deutet darauf hin, dafs die Galle u. U. gerade für Typhusbazillen einen besonders günstigen Nährboden bildet. Es lag daher der Gedanke nahe, vermittels der Galle eine Trennung der Typhus- und Colikeime und eine Anreicherung der ersteren im Bakteriengemisch herbeiführen zu können. Im Auftrage von Herrn Prof. Forster habe ich über diese Frage eine Reihe von Untersuchungen angestellt, über die in den folgenden Zeilen berichtet werden soll.

In den letzten 15 Jahren haben verschiedene Autoren die Galle als Nährboden versucht und Untersuchungen mit den

verschiedensten Bakterien angestellt.[1]) Sie verwandten dabei teils die reine, unveränderte Galle, teils dieselbe im Gemische mit Nährsubstraten und gelangten zu sehr widersprechenden Resultaten. So fand Corrado (2) speziell für Typhusbazillen das Wachstum in Galle indifferent, Mosse (3) glaubte der Galle einen entwickelungshemmenden Einfluſs zusprechen zu müssen, Lenbuscher (4), Fischer (5), Fränkel u. Krause (6) dagegen betrachten die Galle als einen guten Nährboden für Typhus und Colibazillen.

Um zu einem sicheren Urteil in dieser Frage zu gelangen, halte ich die von den genannten Autoren angewandte Untersuchungsmethode, nämlich den makroskopischen Vergleich der Untersuchungsflüssigkeit mit einer Kontrollflüssigkeit nach bestimmten Zeitabständen, nicht für hinreichend. Vielmehr glaube ich, daſs eine möglichst genaue Methode der Untersuchung erforderlich ist und als solche bietet sich naturgemäſs die Ermittelung der Fortpflanzungsgeschwindigkeit.

Die Vermehrung der Bakterien geschieht durch die Zweiteilung des Zellleibes. Der Zeitraum, innerhalb dessen dieser Vorgang abläuft, wird als Generationsdauer bezeichnet. Da nun die Vermehrung eines Bakteriums bei sonst gleichen Wachstumsbedingungen je nach der Güte des Nährbodens schneller oder langsamer verläuft, so muſs sich auch die Generationsdauer in proportionaler Weise ändern. Die Vermehrungsintensität drückt sich also zahlenmäſsig in dem entsprechenden Generationsdauerwerte aus. Das kulturelle Verhalten eines Bakteriums läſst aber deutlich erkennen, daſs die Vermehrung auf jedem Nährboden mit zunehmender Schnelligkeit einsetzt, einen Höhepunkt erreicht, um dann langsam abzunehmen und schlieſslich nach Erschöpfung oder Veränderung des Nährbodens ganz aufzuhören. Es ist also die Vermehrungsintensität in jedem Zeitpunkt eine verschieden starke, die ihren stärksten Grad erreicht hat, sobald die Generationsdauer am kürzesten geworden ist. Die Bestimmung dieser kürzesten Generationsdauerwerte gibt mithin einen ver-

---

1) Näheres hierüber findet sich in meiner, Dezember 1906 der Medizinischen Fakultät der Universität zu Straſsburg eingereichten Inaugural-Dissertation. Straſsburg 1907.

gleichenden Mafsstab für die Wachstumsintensität in den verschiedenen Nährböden.

Von diesem Gedanken ausgehend, gewähren die später folgenden Tabellen einen genauen Einblick in das Wachstum der Typhusbazillen in reiner Galle und in den mit Zusätzen versehenen Gallenflüssigkeiten. Zum Vergleiche wurden meist dieselben Versuche daneben auch für Bakterium coli durchgeführt.

Von den verschiedenen Verfahren der Generationsdauerbestimmung wurde als die genaueste die von Buchner-Longard-Riedlin (7) im Prinzip angegebene, im hiesigen Institute von Max Müller (8) modifizierte und verbesserte Methode gewählt.

Um aus einer relativ geringen Menge (5 ccm) eines flüssigen Kulturmediums eine gröfsere Anzahl von Zählplatten anfertigen zu können, ohne die Kulturflüssigkeit wesentlich zu verringern, werden geeichte Spiralen und Ösen zur Plattenanlage verwendet. Da diese Spiralen und Ösen, deren Fassungsvermögen zeitweise nachkontrolliert, konstant dieselben Mengen fassen, so ermöglicht ihre Anwendung nicht nur eine Materialersparnis der Kultur, sondern auch eine äufserst genaue Zählung der in dieser Menge vorhandenen Bakterien. Durch Überimpfen immer kleiner werdender Kulturmengen auf die Zählplatten, können möglichst genaue zählbare Platten erhalten werden. Auf diese Weise wird gleichzeitig die durch die Verdünnungsmethode entstehende Fehlerquelle solange als möglich vermieden. Nach einer gewissen Zeit wird aber selbst die kleinste Öse eine so dicht besäte Platte geben, dafs eine annähernd genaue Zählung nicht mehr möglich ist. Infolgedessen ist nun eine Verdünnungsmethode nicht mehr zu umgehen. Die kürzeste Generationsdauer ist übrigens in diesem Zeitpunkt meist schon überschritten und die Bakterienzahl so stark angewachsen, dafs bei der Berechnung einige zehntausend Bakterien mehr oder weniger im Kubikzentimeter nicht ins Gewicht fallen. Die durch die Verdünnungsmethode entstehende Fehlerquelle wird auf folgende Weise nach Möglichkeit reduziert:

1. Es wird eine relativ grofse Menge der Kultur (34—9 mg) in das Verdünnungsmedium übergeimpft;

2. Um eine kräftige Durchmischung der Verdünnungsflüssigkeit vornehmen zu können, wird als solche Nährbouillon verwandt;
3. Die Zählplatte wird wiederum mit grofser Menge (34 bis 9 mg) der geimpften Verdünnungsflüssigkeit angelegt;
4. Die Verdünnungsflüssigkeit wird vor der Impfung genau mittels sterilisierter graduierter Pipette in ein steriles Reagenzglas abgemessen.

Verwendet wurden zu allen Untersuchungen drei Spiralen mit einem Fassungsvermögen von 95 mg, 17 mg und 9 mg, sowie die Normalöse von 2 mg. Als Zählplatten wurden, da ich nur mit nicht verflüssigenden Kolonien zu tun hatte, nicht Gelatineplatten mit Petrischen Schalen, sondern die bereits von Max Müller (8) zu diesem Zweck verwandten Esmarchschen Gelatinerollplatten angefertigt. Über die Vorteile dieser Methode, sowie über die Methodik der Zählung der Gelatinerollröhrchen enthält Näheres die gleiche Arbeit. Um die gefundenen Resultate vergleichen zu können, bedarf es der Umrechnung sämtlicher Werte auf ein gleiches Volumen, und zwar am besten auf 1 ccm. Die Berechnung der Generationsdauer erfolgte dann nach der Buchner-Longard-Riedlinschen (7) Formel

$$x = \frac{t \cdot \log 2}{\log b - \log a'}$$

wobei t die Zeit angibt, a die Zahl der Kolonien der »primären« Platte und b die der »sekundären« Platte.

Um nun das Wachstum und die kürzeste Generationsdauer unter sonst gleichen Bedingungen bei verschieden grofser Impfmenge feststellen zu können, verfuhr ich auf folgende Weise: Von einer ca. 14stündigen, bei 37,5° C gewachsenen Bouillonkultur von Bacterium typhi oder coli wurden mit sterilen Pipetten 5 Verdünnungen hergestellt, und zwar:

1.	1,8	ccm	reine Bouillon	+ 0,2	ccm		Kultur	= 2,0	ccm	$^1/_{10}$ Kultur
2.	1,8	»	»	+ 0,2	»	$^1/_{10}$	»	= 2,0	»	$^1/_{100}$ »
3.	1,8	»	»	+ 0,2	»	$^1/_{100}$	»	= 2,0	»	$^1/_{1000}$ »
4.	1,8	»	»	+ 0,2	»	$^1/_{1000}$	»	= 2,0	»	$^1/_{10000}$ »
5.	1,8	»	»	+ 0,2	»	$^1/_{10000}$	»	= 2,0	»	$^1/_{100000}$ »

Von Verdünnung 2, 3 und 4 wurde zunächst, um die Zahl der ausgesäten Keime zu kennen, je ein mit 2 mg beimpftes Zählröhrchen angefertigt, und von Verdünnung 5 ein ebensolches mit 4 mg. Dann wurden aus den verschiedenen Verdünnungen die gleichen Mengen in die zu verwendenden »Gallenröhrchen« übergeimpft. Diese wurden dann in einen Brutofen von 37,5° C gestellt und nach je 2 Stunden mit progressiv kleiner werdenden Mengen Gelatinerollröhrchen angelegt. Die Versuche wurden auf 10 Stunden ausgedehnt, da sich ergab, daſs die kürzeste Generationsdauer für Typhus und Coli bei stärkerer Impfmenge innerhalb dieser Zeit gelegen ist. Dann wurde noch nach 24 Stunden eine Probe entnommen, um die weitere Entwickelung der Kulturen zu beobachten.

Tabelle V gibt die Versuchsanordnung in ausführlicher Weise wieder. In den übrigen Tabellen sind nur die einer näheren Betrachtung zu unterziehenden Werte angegeben.

Zunächst wurden Versuche gemacht mit reiner, sterilisierter Rindergalle, wie sie an der Typhusstation des hygienisch-bakteriologischen Instituts in Straſsburg zur Züchtung von Typhusbazillen aus dem Blute von Erkrankten verwendet wird. ([18]) Diese Rindergalle wird, frisch der Gallenblase entnommen, im strömenden Dampf $^1/_2$ Stunde sterilisiert, dann filtriert, in sterile Reagenzgläser zu je 5 ccm abgefüllt und wieder $^1/_2$ Stunde im strömenden Dampf sterilisiert.

Tabelle I.
Bacterium typhi in 5 ccm sterilisierter Rindergalle.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{10}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 2 mg $^1/_{10000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm Galle			
zu Anfang:	6720	75	8
nach 2 Stunden:	4758	95	steril
» 4 »	6147	158	»
» 6 »	6380	158	»
» 8 »	3621	63	»
» 10 »	2221	31	»
» 24 »	463	steril	»

Tabelle II.

Bacterium coli in 5 ccm sterilisierter Rindergalle.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{10}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 2 mg $^1/_{10000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm Galle			
zu Anfang:	25 900	228	26
nach 2 Stunden:	12 500	210	21
» 4 »	20 660	353	52
» 6 »	93 000	1 000	165
» 8 »	423 000	4 500	500
» 10 »	1 611 000	15 500	2 000
» 24 »	24 333 000	29 889 000	32 775 000

Generationsdauer in Minuten.

	Versuchsreihe I.	Versuchsreihe II.	Versuchsreihe III.
Von 0—2 Stunden:	—	—	—
» 2—4 »	166'	160'	92'
» 4—6 »	55'	80'	72'
» 6—8 »	55'	55'	75'
» 8—10 »	62'	67'	60'
» 10—24 »	214'	77'	60'

Der Versuch mit Bakterium typhi wurde in 12 Versuchsreihen mit den verschiedensten Impfmengen angestellt. Es konnte niemals ein Wachstum konstatiert werden, dagegen stets eine langsame Abnahme und Abtötung der Keime. Nach der 4. bis 6. Stunde zeigte sich regelmäfsig eine geringe Zunahme, die wohl auf eine letzte Zweiteilung der widerstandsfähigsten Keime zurückzuführen ist. Röhrchen mit 2 mg $^1/_{10000}$ Kultur oder etwa 8 bis 13 Keimen pro ccm liefsen schon nach 2 bis 4 Stunden bei Überimpfung von 95 mg in Gelatine keine Kolonien mehr zur Entwicklung kommen. Es beweist dies, dafs die reine, sterilisierte Galle nicht nur keinen guten Nährboden für Bakterium typhi darstellt, sondern dafs sie sogar ausgesprochen entwicklungshemmend wirkt. Zu demselben Resultate gelangte Dr. Fornet(9) bei seinen Untersuchungen über die Bakterizidie der Galle. Er konnte diese Eigenschaft der Galle dem Bacterium typhi gegen-

über sowohl für sterilisierte als auch für frische Rindergalle feststellen.

Ganz anders verhält sich die sterilisierte Galle gegen Bacterium coli. Es wurde in 9 Versuchsreihen stets Wachstum erzielt, auch wenn die Gallenröhre mit nur 2 mg $^1/_{100000}$ Kultur oder etwa 2 Keimen pro ccm beimpft wurde. Wenn die sterilisierte Galle auch kein guter Nährboden für Bacterium coli ist, in Anbetracht einer kürzesten Generationsdauer von 55', so ist doch sicher, dafs sie ihm gegenüber keine bakteriziden Eigenschaften besitzt.

Nachdem es mir gelungen war, frische sterile menschliche Galle zu erhalten, wurden auch damit Versuche angestellt. Bei der Entnahme verfuhr ich nach der von Fränkel und Krause (6) empfohlenen Methode: Die Gallenblase wird bei der Sektion nach vorherigem Unterbinden des ductus choledochus von der Leber abgetrennt, in fliefsendem Wasser abgewaschen, 3 Minuten in Sublimat (5 : 1000) gebracht und bis zur definitiven Verarbeitung in steriles Wasser gelegt. Dann wird der Fundus der Gallenblase über der Bunsenflamme abgesengt, mit steriler Punktionsspritze an dieser Stelle die Galle entnommen und in sterile Reagenzgläser zu 5 ccm abgefüllt. Hierauf stellte ich einerseits die Sterilität der Galle fest durch Überimpfen einer verhältnismäfsig grofsen Menge (95 mg) in Bouillon und Gelatine, anderseits prüfte ich, ob Sublimatlösung durch die Blasenwand diffundiert wäre, indem jedesmal sofort ein Gallenröhrchen mit 4 mg einer frischen Typhusbouillonkultur beimpft, dann in den Brutschrank gestellt und nach 6 Stunden mehrere Ösen auf einer Endo-Agarplatte ausgestrichen wurden. Letztere zeigte nach 24 Stunden dann zahlreiche typische Kolonien.

Die Galle stammte einmal von einer 50jährigen Frau, die an Lungenembolie infolge Thrombose der Vena femoralis gestorben war, das 2. Mal von einem 30jährigen Arbeiter, der durch ausströmenden Dampf verbrüht war. Sie konnte im ersten Falle 20, im zweiten 18 Stunden post mortem entnommen werden. Eine dritte Galle stammte von einer 42jährigen Frau, Todes-

ursache akute Myocarditis; die Entnahme erfolgte 25 Stunden post mortem.

Für die gütige Überlassung des Materials spreche ich Herrn Prof. v. Recklinghausen meinen verbindlichsten Dank aus.

Es zeigte sich nun, dafs sowohl Typhus- als auch Colibazillen nicht in allen Fällen in der frischen menschlichen Galle sich vermehren. Entsprechend den Angaben in Tabelle III wurde in 6 Versuchsreihen bei Typhus und in ebensovielen bei Colibazillen eine schnelle Abnahme der Keime beobachtet. In 6 weiteren Versuchen mit anderer Galle, und zwar von Fall 2 und 3 ergab sich Wachstum, und zwar war dasselbe wieder in beiden Gallen verschieden, wie Tabelle IV erkennen läfst. Es legte diese Beobachtung den Gedanken nahe, dafs die Zusammensetzung der verschiedenen Gallen hierbei eine Rolle spielte.

Tabelle III.
Bacterium typhi und Bacterium coli in 5 ccm frischer Menschengalle.

Eingeimpfte Menge:	Bacterium typhi 2 mg Kultur	Bacterium coli 2 mg Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm Galle zu Anfang:	139 200	332 400
nach 2 Stunden:	19 760	426 300
» 4 »	1 042	22 730
» 6 »	325	7 210
» 8 »	125	4 084
» 10 »	52	2 242
» 24 »	10	95

Tabelle IV.
Bacterium typhi in 5 ccm frischer Menschengalle.

Eingeimpfte Menge:	Galle von Fall 2. 2 mg $^1/_{100}$ Kultur	Galle von Fall 3. 2 mg $^1/_{10000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm Galle zu Anfang:	1 392	12
nach 2 Stunden:	7 390	31
» 4 »	27 160	390
» 6 »	61 900	4 352
» 8 »	119 370	45 463
» 10 »	221 000	463 700
» 24 »	unzählbar.	

Generationsdauer.

	Galle 2.	Galle 3.
Von 0—2 Stunden:	50'	88'
» 2—4 »	64'	33'
» 4—6 »	101'	34'
» 6—8 »	127'	35'
» 8—10 »	135'	36'

Den Hauptbestandteil der Galle bilden die Glykochol- und die Taurocholsäure, und zwar finden sich diese beim Menschen in sehr wechselndem Verhältnis, stets aber prävaliert die Glykocholsäure. Zu den spezifischen Gallenbestandteilen gehören ferner die Gallenfarbstoffe, das Bilirubin und das Biliverdin. Je nach dem Überwiegen des einen oder anderen und je nach der Menge derselben ist die Galle gelb, braun oder grün gefärbt. Aufserdem enthält die Galle stets noch Seifen, Lecithin und Cholesterin, letzteres gelöst durch die Seifen und gallensauren Salze. Schliefslich gehört noch zu den konstanten Gallenbestandteilen das Mucin, eine Verbindung von Eiweifs mit einem kolloidalen Kohlehydrat, das von den Epithelzellen der Gallenwege und insbesondere der Gallenblase abgesondert wird. Dafs diese einzelnen Bestandteile in äufserst wechselnden Mengen in der menschlichen Galle enthalten sind, veranschaulicht sehr gut eine von Bunge (10) zusammengestellte Tabelle. Dieser Unterschied ist schon bei möglichst normaler Galle (Material stammt von Hingerichteten) auffallend, noch gröfser aber in dem bei Sektionen entnommenen Material.

Ohne Zweifel ist nun die Zusammensetzung der Galle von gröfster Bedeutung für das Wachstum der eingeimpften Bakterien, und nur so kann ich das ungleiche Verhalten der Typhus- und Colikeime in den verschiedenen Gallen erklären.

Talma (11) studierte am lebenden Tiere den Einflufs der Galle auf Typhus- und Colibazillen durch Einspritzen derselben direkt in die möglichst wenig verletzte Gallenblase. Er konstatierte im allgemeinen eine hemmende Wirkung der Galle, die jedoch zu verschiedenen Zeiten und bei verschiedenen Tieren ungleich

war, also offenbar je nach der Zusammensetzung der Galle mehr oder weniger sich geltend machte.

Für die Beurteilung der Wachstumsverhältnisse in der Galle innerhalb des menschlichen Organismus, scheint mir die Beobachtung von gröfster Bedeutung, dafs in den zahlreichen Fällen, wo Typhusbazillen in der Galle gefunden wurden, die Galle oder die Gallenblase pathologische Veränderungen zeigte.

Chiari (12) fand bei 19 in bezug auf den Nachweis von Typhusbazillen in der Gallenblase positiven Fällen 13 mal eine Entzündung der Gallenblase. Sie stellte sich dar als eine mehr oder weniger stark entwickelte leukozitäre Infiltration der Mucosa, kombiniert mit Hyperämie und Ödem. Das Epithel war gröfstenteils defekt. Von den übrigen 6 positiven Fällen zeigten 3, bei denen die Gallenblase überhaupt untersucht wurde, Nekrose der inneren Lage der Mucosa. Die Galle war bei allen positiven Fällen getrübt, graugelb oder weifslich-schleimig oder hellgelbflockig und enthielt bei mikroskopischer Betrachtung viele Epithelien und Leukozyten. Prof. Forster und Kayser (1) fanden in 7 Fällen mit Typhusbazillen in der Galle stets die Galle abnorm: bald schleimig gelb, fast eitrig, dann wieder körnig trüb, schmutzigbraun oder dunkelgrün und sehr zäh. Stets sahen auch sie entzündliche Formelemente darin. Dieselben Befunde hatte Dörr (13) bei Tierversuchen. Bei Kaninchen, die mit je zwei Ösen lebender 24 stündiger Typhusagarkultur intravenös injiziert und nach verschiedenen Zeiträumen getötet wurden, fand er schon am 2. Tage nach der Injektion die Galle pigmentfrei, von Eiterflocken durchsetzt, die Blase ausgedehnt, die Wand verdickt. Diese Cholecystitis fand sich auch bei den Tieren, die am 4., 7., 10., 14., 21., 33. und 40. Tage getötet wurden, nicht aber mehr am 54. und 100. Tage, und in letzterem Falle waren auch die Typhusbazillen verschwunden.

Dagegen waren dieselben noch vorhanden bei einem Tiere nach 120 Tagen, und hier zeigten sich, wie bei den anderen Tieren, pathologische Veränderungen der Gallenblase und ihres Inhaltes. Dörr schliefst hieraus, dafs sich die Invasion der Typhuskeime in die Gallenblase wohl niemals ohne entzündliche

Reaktion der Mucosa zu vollziehen scheint, und nimmt an, dafs die vermehrte Absonderung des Schleimhautsekretes, die Auswanderung von Leukozyten, kurz alle durch die Entzündung hervorgerufenen Veränderungen der Galle selbst, begünstigend und fördernd auf das Wachstum der Typhusbazillen einwirken. Wie der folgende Versuch erkennen läfst, zeigte eine derartige Veränderung der Galle wenigstens aufserhalb des Körpers für die Entwicklung der Typhusbazillen einen auffallenden Unterschied gegenüber dem Wachstum in nicht veränderter, frischer Galle.

Es wurden zu drei Röhrchen mit je 5 ccm frischer menschlicher Galle, in der vorher kein Wachstum erfolgt war, je 1 ccm eines serös-eitrigen Exsudats hinzugefügt und hierauf die Röhrchen mit verschiedenen Mengen einer ca. 14stündigen Typhus-Bouillonkultur geimpft.

Das serös-eitrige Exsudat hatte ich auf folgende Weise gewonnen: Einem Kaninchen wurden 5 ccm einer Aleuronatlösung (auf 40 ccm 0,8 % Kochsalzlösung 6 g Aleuronat, 1 Stunde sterilisiert bei 120°) intrapleural injiziert. Nach 48 Stunden konnte dann, nachdem das Kaninchen verblutet war, das Exsudat steril entnommen werden. Die Versuchsanordnung ist aus der ausführlich angeführten Tabelle ersichtlich.

Aus der Tabelle V geht nun deutlich hervor, dafs die wachstumhemmende Wirkung, die in dieser Galle ursprünglich vorhanden war, durch den Zusatz des serös-eitrigen Exsudats vollständig aufgehoben wurde, und es zeigte sich jetzt diese Gallenflüssigkeit für die Entwickelung der Typhusbazillen als ein aufserordentlich günstiger Nährboden. Wurden doch bereits nach 24 Stunden Werte erreicht, wie sie Hehewerth ([14]) bei seinen Generationsdauerbestimmungen von Typhusbazillen erst nach 36 Stunden und später feststellen konnte. Es ist nun nach dem oben Gesagten sehr gut denkbar, dafs innerhalb des Organismus durch die Invasion der Typhuskeime, welche das Blut während des Fiebers durch Vermittlung der Leber in die Galle liefert (cf. Literatur 1 u. 18), ähnliche günstige Wachstumsbedingungen in der Gallenblase geschaffen werden wie hier, und dafs darauf die Vermehrung der Keime zurückzuführen ist.

Tabelle V.

Bacterium typhi in 5 ccm frischer Menschengalle + 1 ccm serös-eitrigen Exsudats.

Versuchsreihe I.

Eingeimpfte Menge: 2 mg $^1/_{10}$ Kultur.

Überimpfte Menge:	Gröfse des gezählten Feldes	Zahl der Kolonien im Felde	Zahl der Kolonien der Platte	Bakterienzahl in 1 ccm	Zeit nach der Impfung
—	—	—	—	z. Anf.: 11 040	—
17 mg	ganz	1 054	1 054	62 000	2 Stdn.
2 mg	»	864	864	432 000	4 »
2 mg	$^9/_{100}$ qcm	20	13 330	6 660 000	6 »
17 mg: 1,7 ccm Bouillon — 17 mg	$^9/_{100}$ »	19	12 666	74 510 000	8 »
do. — 17 mg	$^1/_{25}$ »	28	42 000	247 060 000	10 »
7 mg : 4,5 ccm Bouillon — 9 mg	$^1/_{25}$ »	17,1	25 650	1 425 000 000	24 »

Versuchsreihe II.

Eingeimpfte Menge: 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur.

Überimpfte Menge:	Gröfse des gezählten Feldes	Zahl der Kolonien im Felde	Zahl der Kolonien der Platte	Bakterienzahl in 1 ccm	Zeit nach der Impfung
—	—	—	—	zu Anf.: 107	—
95 mg	ganz	66	66	695	2 Stdn.
95 »	»	423	423	4 452	4 »
95 »	$^1/_4$ qcm	24	5 760	60 630	6 »
9 »	$^1/_{25}$ »	7,8	11 700	1 300 000	8 »
2 »	$^1/_{25}$ »	18	27 000	13 500 000	10 »
9 mg : 4,5 ccm Bouillon — 9 mg	$^1/_{25}$ »	16,7	25 050	1 391 600 000	24 »

Versuchsreihe III.

Eingeimpfte Menge: 4 mg $^1/_{100000}$ Kultur.

Überimpfte Menge:	Gröfse des gezählten Feldes	Zahl der Kolonien im Felde	Zahl der Kolonien der Platte	Bakterienzahl in 1 ccm	Zeit nach der Impfung
—	—	—	—	z. Anfang: 3	—
95 mg	ganz	1,5	1,5	16	2 Stdn.
95 »	»	13	13	137	4 »
95 »	»	116	116	1 221	6 »
95 »	$^1/_4$ qcm	11	2 650	27 900	8 »
95 »	$^1/_{25}$ »	22,3	33 497	352 630	10 »
9 mg : 4,5 ccm Bouillon — 9 mg	$^1/_{25}$ »	12,7	19 050	1 058 333 000	24 »

Generationsdauer.

	Versuchsreihe I.	Versuchsreihe II.	Versuchsreihe III.
Von 0—2 Stunden:	48′	44′	50′
» 2—4 »	43′	45′	39′
» 4—6 »	30′	32′	38′
» 6—8 »	34′	27′	27′
» 8—10 »	69′	36′	33′
» 10—24 »	332′	126′	73′

Bei den folgenden Versuchen verwandte ich stets wieder sterilisierte Rindergalle, und zwar mit Zusätzen von Nährstoffen. Es ergab sich nun die bemerkenswerte Erscheinung, dafs auch hierdurch die wachstumhemmende Wirkung der Galle beseitigt werden konnte. Ahnliche Beobachtungen hatte Finkh (15) in bezug auf Blutserum gemacht. Ihm war es gelungen, durch Zusatz von Nährstoffen, Pepton, Pepton- und Traubenzucker, für Bacterium typhi speziell von Kalisalpeter, die bakterizide Wirkung des Normalserums vollständig zum Verschwinden zu bringen, in vielen Fällen sogar ein lebhaftes Wachstum der Bakterien zu erzielen. Später hat Kayser (18) Blut von normalen und immunisierten Kaninchen (ca. 2,5 ccm) mit Galle zusammengebracht und die bekannte normale und spezifische Blutbakterizidie (gegenüber 2—20 Tyhphuskeimen) paralysieren können.

In neuester Zeit wurde dann von Conradi (16) die Beobachtung gemacht, dafs auch bei Zusatz von 0,1 bis 1,0 ccm Galle zur gleichen Menge aktiven Normalserums lebhaftes Wachstum der Typhusbazillen eintrat, während nach Angabe dieses Autors schon 0,3 ccm normales Meerschweinchenserum ca. 20000 Typhusbazillen binnen 2 Stunden bei 37° abtöten.

Ich selbst habe eine Reihe von Versuchen mit frischem Kaninchenserum gemacht, und zwar fügte ich zu 5 ccm Galle 1 ccm Serum. Wie aus Tabelle VI zu erfahren ist, besitzt dieser Nährboden aufserordentlich günstige Bedingungen für die Entwickelung der Typhusbakterien.

Da nun zweifellos das wenig verdünnte Normalserum eine hohe bakterizide Eigenschaft besitzt, dieselbe aber, wie aus

meinen ersten Versuchen hervorgeht, in nicht unbedeutendem Maſse auch der Galle zukommt, so ist anzunehmen, daſs im Gemische dieser beiden Flüssigkeiten eine Neutralisierung der bakteriziden Kräfte eintritt, und daſs durch die im Serum enthaltenen, reichlichen Nährstoffe das lebhafte Wachstum der eingeimpften Bakterien unterhalten wird.

Tabelle VI.

Bacterium typhi in 5 ccm sterilisierter Rindergalle + 1 ccm frischen Kaninchenserums.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{10}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 4 mg $^1/_{100000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm zu Anfang:	9 040	112	3
nach 2 Stunden:	7 823 •	147	—
» 4 »	39 000	1 790	21
» 6 »	610 000	18 310	358
» 8 »	8 230 000	127 000	4 095
» 10 »	23 047 000	595 260	19 580
» 24 »	32 555 000	40 111 000	38 889 000

Generationsdauer.

	Versuchsreihe I.	Versuchsreihe II.	Versuchsreihe III.
Von 0—2 Stunden:	—	306′	86′ (0—4)
» 2—4 »	52′	33′	
» 4—6 »	30′	36′	29′
» 6—8 »	32′	43′	34′
» 8—10 »	81′	54′	53′
» 10—24 »	—	138′	77′

In weiteren Versuchen setzte ich der Galle an Nährstoffen zu: fraktioniert-sterilisiertes Blutserum 1 ccm und Löfflersche Nährbouillon 2 ccm auf 5 ccm Galle. Das Resultat zeigen die Tabellen VII und VIII.

Ein Vergleich der Tabellen VI, VII und VIII läſst erkennen, daſs bei Zusatz von ca. 2 ccm Bouillon die günstigsten Wachstumsbedingungen bestehen, indem hier die kürzeste Generationsdauer 26′ beträgt gegen 30′ bei Zusatz von frischem Serum und 40′ bei Zusatz von fraktioniert-sterilisiertem Blutserum. Das

Wachsum der Typhusbazillen gestaltet sich bei Anwesenheit von 2 ccm Bouillon sogar günstiger, als es Müller(19) und Hehewerth (14) bei ihren Generationsdauerbestimmungen in reiner Bouillon konstatierten, so daſs der Galle hier direkt ein entwickelungsfördernder Einfluſs zugesprochen werden muſs.

Tabelle VII.

Bacterium typhi in 5 ccm Galle + 1 ccm fraktioniert-sterilisiertes Blutserum.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{10}$ Kultur	Versuchsreihe II. 1 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 4 mg $^1/_{100000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm z. Anfang:	9 840	95	etwa 1
nach 2 Stunden:	28 760	84	—
» 4 »	134 100	325	21
» 6 »	890 000	1 936	102
» 8 »	3 750 000	12 950	668
» 10 »	12 750 000	53 647	5 190
» 24 »	63 055 000	65 250 000	81 444 000

Generationsdauer.

	Versuchsreihe I.	Versuchsreihe II.	Versuchsreihe III.
Von 0—2 Stunden:	78′	—	} 55′
» 2—4 »	54′	61′	
» 4—6 »	44′	47′	53′
» 6—8 »	58′	44′	44′
» 8—10 »	68′	59′	41′
» 10—24 »	364′	82′	60′

Tabelle VIII.

Bacterium typhi in 5 ccm Galle + 2 ccm Nährbouillon.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{100}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 4 mg $^1/_{100000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm z. Anfang:	790	81	etwa 1
nach 2 Stunden:	1 337	84	—
» 4 »	8 726	105	—
» 6 »	214 700	370	21
» 8 »	4 500 000	1 463	142
» 10 »	z. stark beimpft, unzähl.	9 764	1 221
» 24 »	66 070 000	78 211 000	64 376 000

Generationsdauer.

<table>
<tr><th></th><th>Versuchsreihe I.</th><th>Versuchsreihe II.</th><th>Versuchsreihe III.</th></tr>
<tr><td>Von 0—2 Stunden:</td><td>158'</td><td>—</td><td rowspan="3">82'</td></tr>
<tr><td>» 2—4 »</td><td>44'</td><td>373'</td></tr>
<tr><td>» 4—6 »</td><td>26'</td><td>66'</td></tr>
<tr><td>» 6—8 »</td><td>27'</td><td>61'</td><td>43'</td></tr>
<tr><td>» 8—10 »</td><td rowspan="2">247'</td><td>44'</td><td>39'</td></tr>
<tr><td>» 10—24 »</td><td>65'</td><td>54'</td></tr>
</table>

Der Zusatz von 2,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung zu 5 ccm Galle zeigte sich nicht als hinreichend, das Absterben der Typhusbazillen in Galle völlig zu verhindern. Es ergab sich (cf. Tabelle IX) zunächst in allen Versuchsreihen eine starke Abnahme der Keime, dann ein langsames Ansteigen. Ein mit 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur oder etwa 74 Keimen pro ccm geimpftes »Gallenröhrchen« nahm stetig an Bakterienzahl ab und war nach 24 Stunden steril. Das wenn auch geringe Wachstum in Versuchsreihe I und II glaube ich der gröfseren eingeimpften Bakterienmenge bei verminderter Konzentration der Galle zusprechen zu müssen.

Tabelle IX.

Bacterium typhi in 5 ccm Galle + 2,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{10}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{100}$ Kultur	Versuchsreihe III. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm zu Anfang:	7 232	723	74
nach 2 Stunden:	4 652	579	42
» 4 »	4 537	684	31
» 6 »	4 379	810	31
» 8 »	4 590	831	21
» 24 »	22 100	1 621	steril.

In neuerer Zeit wird die Galle vielfach praktisch verwendet zur Anreicherung der Typhusbazillen aus dem Blut von Erkrankten in den ersten Fiebertagen. Conradi (17) verwendet hierzu sterilisierte Rindergalle, der er zur Erhöhung ihrer gerinnungshemmenden und wachstumbegünstigenden Eigenschaft 10% Pepton hinzufügt, aufserdem 10% Glyzerin, um die Entwickelung

störender Saprophyten zu hemmen. Zu dieser Gallenflüssigkeit wird Patientenblut zugesetzt, so dafs sich die Blutmenge zur Gallenflüssigkeit verhält wie 1:3. — Kayser(18) empfiehlt die reine Galle, ohne jeden Zusatz, und vermischt mit 5 ccm derselben bis zu 2,5 ccm Blut. Nach seiner Angabe gelingt die Anreicherung bei Anwendung von 5 ccm Galle auch aus weniger als 2,5 ccm Typhusblut. Bei der Conradischen wie bei der Kayserschen »Gallenröhre« handelt es sich also im wesentlichen um den Zusatz einer nährstoffhaltigen Substanz, nämlich des Blutes zur Galle. Es war nun von Interesse, die Wachstumsgeschwindigkeit der Typhusbazillen auch für diese beiden praktisch wichtigen Nährböden festzustellen.

Die Conradische Gallenflüssigkeit wurde genau nach Angabe des Autors hergestellt und zu 5 ccm in sterilisierte Reagenzgläser gefüllt. Zu diesen Röhrchen, sowie zu den einfachen Kayserschen Gallenröhrchen mit 5 ccm reiner, sterilisierter Galle wurden 2,5 ccm Blut aus der spritzenden Kaninchenkarotis hinzugefügt. Im weiteren wurde analog den übrigen Versuchen verfahren.

Tabelle X.

Bacterium typhi in der Conradischen Gallenflüssigkeit.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{100}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 2 mg $^1/_{10000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm z. Anfang:	413	50	5
nach 2 Stunden:	1 526	312	28
» 4 »	20 530	2 500	267
» 6 »	496 000	26 500	2 920
» 8 »	4 012 000	573 000	32 680
» 10 »	13 027 000	4 836 000	702 000
» 24 »	159 500 000	228 000 000	237 000 000

Generationsdauer.

	Versuchsreihe I.	Versuchsreihe II.	Versuchsreihe III.
Von 0—2 Stunden:	64'	45'	48'
» 2—4 »	32'	40'	37'
» 4—6 »	26'	35'	35'
» 6—8 »	40'	27'	34'
» 8—10 »	71'	39'	27'
» 10—24 »	232'	152'	100'

Tabelle XI.

Bacterium coli in der Conradischen Gallenflüssigkeit.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{100}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 2 mg $^1/_{10000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm z. Anfang:	1 950	180	22
nach 2 Stunden:	17 500	1 960	415
» 4 »	1 164 000	130 000	18 500
» 6 »	25 000 000	4 992 000	1 020 000
» 8 »	142 000 000	85 500 000	21 075 000
» 10 »	277 000 000	170 500 000	153 000 000
» 24 »	339 000 000	369 500 000	491 500 000

Generationsdauer.

	Versuchsreihe I.	Versuchsreihe II.	Versuchsreihe III.
Von 0—2 Stunden:	38′	35′	28′
» 2—4 »	20′	20′	22′
» 4—6 »	27′	23′	21′
» 6—8 »	48′	28′	27′
» 8—10 »	124′	120′	42′

Tabelle XII.

Bacterium typhi in der Kayserschen Gallenröhre.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{10}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 4 mg $^1/_{100000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm z. Anfang:	7 860	76	1
nach 2 Stunden:	29 470	245	—
» 4 »	177 900	958	10
» 6 »	1 185 000	3 917	36
» 8 »	14 025 000	18 024	139
» 10 »	121 500 000	96 500	710
» 24 »	225 000 000	214 500 000	z. stark beimpft, unzähl.

Generationsdauer.

	Versuchsreihe I.	Versuchsreihe II.	Versuchsreihe III.
Von 0—2 Stunden:	63′	71′	} 72′
» 2—4 »	46′	61′	
» 4—6 »	44′	59′	65′
» 6—8 »	34′	54′	61′
» 8—10 »	38′	49′	51′
» 10—24 »	—	76′	—

Tabelle XIII.
Bacterium coli in der Kayserschen Gallenröhre.

Eingeimpfte Menge:	Versuchsreihe I. 2 mg $^1/_{100}$ Kultur	Versuchsreihe II. 2 mg $^1/_{1000}$ Kultur	Versuchsreihe III. 2 mg $^1/_{10000}$ Kultur
Bakterienzahl in 1 ccm z. Anfang:	1 850	140	12
nach 2 Stunden:	16 000	1 500	107
» 4 »	251 000	24 500	1 180
» 6 »	12 066 500	525 000	19 800
» 8 »	284 350 000	28 275 000	395 500
» 10 »	521 400 000	zu stark beimpft, unzählbar.	26 525 000
» 24 »	990 000 000		unzählbar.

Generationsdauer.

	Versuchsreihe I.	Versuchsreihe II.	Versuchsreihe III.
Von 0—2 Stunden:	39'	35'	38'
» 2—4 »	30'	30'	35'
» 4—6 »	21'	27'	30'
» 6—8 »	26'	21'	28'
» 8—10 »	137'	—	20'

Die Conradische und die Kaysersche »Gallenröhre« sind jedenfalls treffliche Nährböden für Typhus-, allerdings noch in höherem Maſse für Colibazillen. In beiden Nährböden ist der kürzeste Wert für Bacterium coli noch etwa um 2' geringer als Heheworth([14]) ihn in Bouillon konstatierte (22'). Als Ursache für das günstige Wachstum bezeichnet Kayser([18]) auf Grund seiner oben erwähnten Versuche eine spezifische, entwickelungsfördernde Wirkung der Galle im Blutgemisch. Conradi([16]) hebt dann noch neuerdings hervor, daſs die Galle die bakterizide Wirkung des Blutserums allein, ohne Anwesenheit von Blutkörperchen aufhebt, infolgedessen das Wachstum ermöglicht wird. Nach meinen Versuchen glaube ich, daſs hier neben den genannten Gründen in hohem Maſse die Anwesenheit der im Blutserum enthaltenen reichlichen Nährstoffe für die Vermehrung der Typhusbazillen von Bedeutung ist.

Das Wachstum der Colibazillen gestaltete sich in allen untersuchten Nährböden, sowohl in der reinen, frischen oder sterilisierten

Galle, als auch in der durch irgendwelchen Zusatz veränderten Galle weitaus besser, als das der Typhusbazillen, so dafs die Frage einer Anreicherung der letzteren im Bakteriengemisch mittels Galle als aussichtslos bezeichnet werden mufste. Es dürfte aber diese Beobachtung mit dazu beitragen, die schon von Chiari [12] als wahrscheinlich hingestellte, von Forster und Kayser [1] und von Dörr [13] festgestellte Tatsache zu erhärten, dafs die Typhusbazillen auf dem Wege der Blutbahn in die menschliche Gallenblase gelangen. Denn wenn die Infektion auf aszendierende Weise durch den ductus choledochus erfolgte, dann wäre es unverständlich, warum nicht häufiger in Anbetracht der günstigeren Wachstumsbedingungen das zudem lebhaft bewegliche Bacterium coli in der Gallenblase angetroffen wird.

Literaturverzeichnis.

1. Forster und Kayser. Über das Vorkommen von Typhusbazillen in der Galle von Typhuskranken und »Typhusbazillenträgern«. Münch. med. Wochenschr. 1905, Nr. 31.
2. Corrado. Sul passagio dei germi patogeni nella bile e nel contenuto enterico e sull'azione che ne risente. Atti della R. Acad. di Roma XVI. 1891. (Zentralbl. f. Bakt., Bd. XI, p. 696.)
3. Mosse. Kommen der Galle fäulniswidrige und antibakterielle Eigenschaften zu? (Zeitschr. f. klin. Medizin, Bd. 37, p. 527.)
4. Lenbuscher. Einflufs der Verdauungssäfte auf Bakterien. (Zeitschr. f. klin. Medizin 1890, Bd. XVII.)
5. Fischer. Über die Wirkung der Galle auf Typhus- und Milzbrandbazillen. (Inaug.-Dissert. Bonn 1894.)
6. Fränkel und Krause. Bakteriologisches und Experimentelles über die Galle. (Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskr., Bd. 32, pag. 97.)
7. H. Buchner, K. Longard und G. Riedlin. Über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. (Zentralbl. f. Bakteriologie und Parasitenkunde, Bd. II, p. 1.)
8. Max Müller. Über das Wachstum und die Lebenstätigkeit von Bakterien sowie den Ablauf fermentativer Prozesse bei niederer Temperatur unter spezieller Berücksichtigung des Fleisches als Narungsmittel. (Aus dem hygienischen Institut der Universität Strafsburg.) (Inaug.-Dissert. Giefsen 1903. Archiv für Hygiene, 47. Bd.)
9. W. Fornet. Über die Bakterizidie der Galle. (Archiv f. Hygiene 1907. 60. Bd., S. 134.)

10. G. v. Bunge. (Lehrbuch der Physiologie des Menschen 1905, p. 249.)
11. Talma. Over de bactericide werking der gal. (Baumgartens Jahresbericht 1900, p. 593.)
12. Chiari. Über das Vorkommen von Typhusbazillen in der Gallenblase bei Typhus abdominalis. (Zeitschr. für Heilkunde, Bd. 15, 1894.)
13. Dörr. Experimentelle Untersuchungen über das Fortwuchern von Typhusbazillen in der Gallenblase. (Zentralbl. f. Bakt. und Parasitenk., Bd. 39, Nr. 5.)
14. Hehewerth. Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex. Klein und einige Anwendungen derselben. (Archiv f. Hygiene, Bd. 39, pag. 321.)
15. Finkh. Aufhebung der sogenannten bakteriziden Wirkung des Blutserums durch Zusatz von Nährstoffen. (Zentralbl. f. Bakt. und Parasitenk. Bd. 28, p. 694.)
16. Conradi. Über das Verhalten der im Blute der Typhuskranken nachweisbaren Typhusbazillen gegenüber der bakteriziden Wirkung des Blutes. (Münch. med. Wochenschr. 1906, Nr. 28.)
17. Conradi. Verfahren zum Nachweis der Typhuserreger im Blut. (Deutsche med. Wochenschr. 1906, Nr. 2.) Derselbe. Über die Züchtung der Typhusbazillen aus dem Blute mittels der Gallenkultur. (Münch. med. Wochensch. 1906, Nr. 34.
18. Kayser, H. Über die einfache Gallenröhre als Anreicherungsmittel und die Bakteriologie des Blutes bei Typhus sowie Paratyphus. (Münch. med. Wochenschr. 1906, Nr. 17.) Derselbe: Münch. med. Wochensch. 1906, Nr. 40 und: Zentralbl. f. Bakt. 1906, Bd. 42, pag. 18.
19. M. Müller. Über den Einfluſs von Fiebertemperatur auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Virulenz des Typhusbazillus. (Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskr., Bd. 20, p. 245.)

Über Ernährungspolyneuritis.

Abwehr gegen Prof. Dr. C. Eykmans Kritik im gleichnamigen Aufsatz. Dies Archiv, Bd. LVII, S. 151.

Von

Dr. G. Grijns.

(Aus dem Geneeskundig Laboratorium zu Weltevreden, Java.)

In seiner höchst interessanten Arbeit über Ernährungspolyneuritis übt Prof. Eykman, Kritik an Versuchen, welche ich vorher[1]) veröffentlicht habe, über das Auftreten der Polyneuritis bei Hühnern, welche mit sterilisiertem Fleische und bei solchen, die mit ungeschältem Reis ernährt wurden. Ich sah damals unter 8 mit sterilisiertem Fleische gefütterten Versuchstieren Polyneuritis entstehen, und zwar waren bei 3 sowohl die klinischen als auch die pathologischen Änderungen unverkennbar; bei 1 wurden wohl die klinischen Erscheinungen beobachtet, der mikroskopische Befund aber war ein negativer; bei 2 wurde mikroskopisch die Diagnose gestellt, während die klinischen Symptome völlig fehlten, und bei 2 war überhaupt keine Polyneuritis entstanden.

In einer anderen Versuchsreihe ernährte ich Tauben mit Fleisch (in allen diesen Versuchen ist Büffelfleisch verwendet worden), das während 2 Tagen mit einigemal erneuertem Wasser ausgekocht war.

1) Mededeelingen uit het Laboratorium voor Pathol. Anat. en Bacteriol. te Weltevreden over 1900. S. 1. Geneesk. Tydschr. v. Ned. Ind. XLI. Heft 1.

Die 4 Versuchstauben starben alle, nachdem sie die deutlichsten Lähmungserscheinungen dargeboten, und in den Nerven, von denen die Ischiadici und die Radiales nach Marchi untersucht wurden, fand ich unzählige aufs schönste degenerierten Fasern. Bei 3 Kontrolltauben wiesen die nämlichen Nerven nur ausnahmsweise entartete Fasern auf.

Eykman nun nährte 3 Hühner mit Pferdefleisch, das 2 Stunden im Autoklaven bei 120° erhitzt war. 2 starben nach 1 bzw. 4 Monaten, das 3. blieb 4 Monate gesund. Keines zeigte klinisch oder mikroskopisch das Krankheitsbild der Polyneuritis.

Eykman meint deshalb die Richtigkeit meiner beiden Versuchsreihen verneinen zu dürfen, und zieht den Schlufs (Seite 166): »Einstweilen glauben wir daher, den schon früher von uns behaupteten Standpunkt noch nicht aufgeben zu müssen, diesen nämlich, dafs Vorbedingung für die Entstehung der Krankheit die Anwesenheit der Stärke ist.«

Dieselbe Art der Schlufsfolgerung findet man auf Seite 160. Eykman bespricht dort meine Beobachtungen an Hühnern, die mit ungeschältem Reis (gabba) gefüttert wurden. Ich traf bei solchen unter vielen, die ich beobachtete, einigemalen Polyneuritis, und zwar bei einigen sowohl klinisch als mikroskopisch unzweideutig. Eykman versucht nun auch diese Beobachtungen zu beanstanden, indem er schreibt: »Die alsdann absichtlich von ihm mit jener Nahrung angestellten Fütterungsversuche gaben kein eindeutiges Resultat. Nur 2 von 4 Versuchshähnen wurden krank und starben, und zwar ohne typische Motilitätsstörungen gezeigt zu haben. Nervendegeneration war in einem Falle reichlich im andern Falle nur sehr sparsam vorhanden.« Eykman übersieht hier die Hühner Nr. 191 und 192, bei denen sowohl Motilitätsstörung als reichliche Nervendegeneration vorhanden war. Weil aber Eykman die Polyneuritis bei Fütterung mit ungeschältem Reis bei seinen Hühnern nie gesehen hat, heifst es nun: »Doch wird man mein Verlangen billigen, dafs, wo in dieser Hinsicht Unsicherheit besteht, die Wahrnehmungen von Grijns erst von anderer Seite bestätigt werden, ehe denselben beim ziehen von Schlufsfolgerungen eine überwiegende Bedeutung

beigemessen wird. Keinenfalls aber wird, meiner Ansicht nach, der Schlufs, wie bei Grijns lauten dürfen, dafs der Zusammenhang zwischen der Krankheit und der Art der Nahrung ein wenig inniger sei.«

(Ich habe geschrieben a. a. O. S. 36 »lange nicht in einem so innigen Zusammenhang steht, wie es anfänglich schien.«)

Ich frage aber wo oder in welcher Hinsicht hier Unsicherheit besteht? Habe ich doch niemals behauptet, dafs die Erkrankung regelmäfsig bei Ernährung mit ungeschältem Reis auftritt, nur dafs ich sie beobachtet habe. Wenn Eykman dazu die Bestätigung von anderer Seite verlangt, so bedeutet das, dafs Eykman sich das Recht anmafst, die Richtigkeit meiner Beobachtungen anzuzweifeln.

Als Eykman in Amsterdam im zoologischen Garten seine ersten Versuche über Ernährung mit geschältem Reis an 6 Hühnern anstellte, fielen die Versuche alle negativ aus. Nachher in Utrecht hatte er mit indischen Hühnern auch keinen Erfolg. Setze man nun den Fall, dafs diese Versuche von einer anderen Person angestellt worden waren, und diese hatte daraus gefolgert, dafs die von Eykman in Batavia gemachten Beobachtungen unsicher seien, und ihnen keine Beweiskraft beizumessen sei. Hätte Eykman eine solche Behauptung gelten lassen? Oder sollte irgend ein ernster Untersucher sich von solcher Beweisführung irreleiten lassen?

Wenn Eykman (S. 157) sagt, »diese Beobachtung wäre wohl geeignet, alles, was sowohl von mir, als auch von Grijns gefunden worden über den Zusammenhang zwischen der Art der Ernährung und der Polyneuritis der Hühner, ins Schwanken zu bringen«, so erklärt dies zwar, weshalb er gerne meine Beobachtungen als unrichtig betrachten möchte, aber mit Theorien bestreitet man keine Tatsachen. Und der Eykmansche Versuch mit den 3 Hühnern, von denen 1 schon nach 1 Monat einer anderen Ursache erlag, die beiden anderen nur 4 Monate bebachtet wurden, ist doch bei zu kurzer Frist und an zu wenig Tieren vorgenommen, um einen so weitgehenden Schlufs daraus zu ziehen. Schrieb doch Eykman früher selber: »Vorher hatten

wir schon gesehen, wie Tiere, welche monatelang bei einer bestimmten Ernährung sich wohl befanden und gediehen, am Ende doch infolge dieser Nahrung von der Krankheit ergriffen werden konnten«.[1]) Dieser Umstand hatte nämlich Eykman früher zu dem später von ihm als unrichtig erachteten Schlufs geführt, dafs das Gekochtsein des Reises das Entstehen der Polyneuritis bedinge. Das hätte zur Vorsicht mahnen sollen. Und etwas weiter liest man: »Nur eine dauerhafte Genesung ist in dieser Hinsicht beweisend.«

Schliefslich mufs ich Einwand erheben gegen Eykmans Darstellung meiner Schlufsfolgerungen aus meinen Versuchen über Kartoffelmehl und Milchzucker. Eykman läfst nämlich bei dem Zitat die ersten in meiner Abhandlung nicht in Kursivschrift gedruckten Worte[2]) »in den in diesem Abschnitte mitgeteilten Versuchen« fort. Ich habe gar nicht versucht, die von Eykman gefundenen Unterschiede »aus der Welt zu schaffen«, wohl aber zu zeigen, dafs auch bei Kartoffelstärke und bei Milchzucker als Hauptnahrung die Polyneuritis auftreten kann, falls man dafür sorgt, dafs keine schützenden Stoffe, es seien beigegebene oder durch Eiweifsmangel aus dem eigenen Körper entnommene, mit ins Spiel kommen.

Eykman hebt nun hervor, dafs in den Phaseolis auch Stärke enthalten ist, und dafs sich aus dieser beim Sterilisieren ein Nervengift (oder eine Verbindung, aus der im Darmtraktus etwa ein Nervengift abgespalten werden könnte) bilden kann. Diese Behauptung habe ich aber widerlegt durch folgenden Versuch: 3 Hähnen, die durch Verfütterung von geschältem Reis erkrankt waren und deutliche Lähmungen aufwiesen, wurden nachher täglich 35 gr sterilisierte Bohnen verabreicht, denen 7 gr frische zugemischt waren. Alle 3 genasen. Dieser Versuch, mit dem ich schon im Juli 1900 angefangen habe, ist zwar noch nicht veröffentlicht, ich habe aber damals Prof. Eykman die Ergebnisse in extenso brieflich mitgeteilt.

---

1) Jaarverslag 1895, S. 250. Die Übersetzung ist von mir.

2) a. a. O. S. 34.

Man kann also schwerlich in meinen Versuchen mit Kartoffelstärke und Milchzucker die Erkrankung einem Gifte zuschreiben, das in den Bohnen gebildet wird.

Ich habe schon damals ins Licht gestellt, wie unwahrscheinlich eine Annahme ist, nach welcher, aus so grundverschiedenen Substanzen immer wieder dasselbe Gift gebildet werden mufs, und dafs auf der anderen Seite das Gegengift in so sehr verschiedenen Nahrungsmitteln vorrätig sei. Viel einfacher und weniger gezwungen ist die Vorstellung, dafs es in verschiedenen Nahrungsmitteln Stoffe gibt, welche für die Erhaltung des Nervensystems notwendig sind, und deren Entziehung entweder direkt oder durch Aufhebung der Resistenz gegen Krankheitsursachen die Entartung der Nerven bedingt. Diese Stoffe müssen im Pflanzen- und Tierreich sehr ungleichmäfsig verbreitet sein und durch gewisse Umstände z. B. Erhitzung in gespannten Wasserdampf, zersetzt werden.

Pflichtet man dieser Anschauung bei, und gibt man die spezifische Stärketheorie auf, dann platzen weder die Entstehung der Polyneuritis bei Ernährung mit sterilisiertem oder mit ausgelaugtem Fleische noch das Auftreten derselben in vereinzelten Fällen bei Gabbafütterung, noch das Ausbleiben der Krankheit bei auf geschälten Reis gehaltenen Hühnern (vorzugsweise bei Hennen, wie auch Eykman beobachtet hat) wie eine Bombe in unser System. Denn wir wissen, dafs die verschiedenen Individuen derselben Spezies nicht alle die gleichen Stoffwechselbedürfnisse haben. Wir haben das bei der künstlichen Ernährung der Säuglinge so oft erfahren, dafs uns, wenn wir auch das Warum nicht wissen, die Tatsache mehr oder weniger geläufig geworden ist. So nimmt es uns nicht so grofs wunder, wenn auch die Erklärung noch mangelt, dafs bei einer Nahrung, die den meisten Hühnern ausgezeichnet bekömmlich ist, doch noch welche erkranken können, andererseits, dafs eine Kost, der der gröfste Teil der Versuchstiere erlag, von anderen gut vertragen wird.

Ja man ahnt sogar die Richtung, nach welcher man die Deutung der Ergebnisse der Eykmanschen Versuche mit Kartoffel-

stärke und Zucker zu suchen haben werde. Nach Voit[1]) setzen die Kohlehydrate den Eiweifsverlust (im Hungerversuch) um 9 bis 15% herab. Nach Rubner kann man durch leichtverdauliche Kohlehydrate die Eiweifszersetzung sogar auf ein Drittel verringern. Auch aus den Tabellen in Rubners Bearbeitung des physiologischen Teiles in von Leydens Handbuch der Ernährungstherapie geht hervor, dafs der minimale Eiweifsbedarf nicht nur von der Menge, sondern von der Art der Kohlehydrate abhängig ist. Man darf also annehmen, dafs, wenn man Tiere mit einem bestimmten Kohlehydrat unter Zusatz einer minimalen Menge Fleisches ernähren will, man das Fleischquantum den verschiedenen Arten der Kohlehydrate entsprechend verschieden wählen mufs, um genau dem Eiweifsbedarf zu genügen. Gibt man zu wenig Fleisch, dann mufs das Tier, weil sein Eiweifsumsatz nicht unter ein bestimmtes Mafs sinken kann, aus seinem eigenen Organeiweifs nachhelfen, um das Defizit auszugleichen. In dem Falle zehrt das Tier hauptsächlich aus seinen eigenen Muskeln, und es ist wohl selbstverständlich, dafs es unter diesen Bedingungen nicht mehr als das Allernotwendigste seinem Körperbestand entnimmt.

Hieraus ergibt sich gleich, warum ein Huhn, das hungert, keine Nervenentartung bekommt. Es lebt (wie ich schon damals betonte) von seinen eigenen Muskeln, hat also fast ausschliefslich Fleischnährung, wobei, wie wir sahen, keine Entartung der Nerven aufzutreten pflegt. Genasen doch in vielen Versuchen von Eykman kranke Hühner bei ausschliefslicher Fleischkost auffallend schnell, wodurch wir gezwungen wurden, in dem Fleische ein oder mehrere Substanzen anzunehmen, die den Ausbruch der Polyneuritis verhindern, event. die Lähmung rückgängig machen können.

Verfüttern wir aber Stärke mit zu wenig Fleisch, um dem Eiweifsbedarf zu genügen, und mufs das Huhn aus dem eigenen Körper zehren, dann wird jedesmal von den Versuchsbedingungen bestimmt werden, wie grofs der minimale

1) E. Voit, Zeitschr. f. Biologie, XXXII, S. 117 (zitiert n. Referat).

Eiweifsbedarf, und deshalb auch wie grofs die Summe der protektiven Substanzen sein wird, die bei der Verdauung des Fleisches im Darmkanal und dem Zerfall Eiweifs liefernder Organbestandteile in den Kreislauf gelangen und also dem Nervensystem zur Verfügung kommen.

Nun wird Kartoffelstärke von Enzymen weniger leicht angegriffen, als andere Stärkesorten, und man kann es also nicht zu den leicht resorbierbaren rechnen. Es wird deshalb bei Kartoffelstärke als Hauptnahrung mehr Muskelfleisch aufgezehrt werden und es werden deswegen bei Kartoffelstärkenahrung in den Kreislauf mehr Schutzstoffe gelangen als bei Verfütterung anderer Stärkearten. Und es ist möglich, dafs dieses Plus gerade reicht um die Krankheit fern zu halten.

Wird nun aber die Kartoffelstärke in Dampf sterilisiert, wobei sie mehr oder weniger in Kleister umgewandelt werden mufs, und also leichter für Enzymen angreifbar, so wird sie wahrscheinlich auch leichter verdaulich werden, deshalb weniger Eiweis als Minimumbedarf fordern, wodurch weniger Organeiweis aus dem eigenen Körper entzogen wird. Es werden dann aber auch weniger Schutzstoffe in den Kreislauf gelangen und die Bedingungen für das Entstehen der Polyneuritis sind gegeben.

So wäre eine Vorstellung über das verschiedene Verhalten der frischen und der gedämpften Kartoffelstärke in den Eykmanschen Versuchen möglich.

Man könnte hiergegen einwenden, dafs dann bei Fütterung von Zuckerarten und wenig Fleisch das Auftreten der Krankheit erst recht zu erwarten wäre, dem doch durch den Versuch widersprochen wird. Es ist aber eine Eigentümlichkeit des Lebens, dafs fast alle bei demselben gefundenen Funktionen durch Kurven mit einem Maximum dargestellt werden müssen; und es gibt Gründe, zu vermuten, dafs solches auch hier der Fall sein werde. Der Zucker wird ja aufserordentlich schnell resorbiert, so lange keine Verdauungsstörungen vorliegen, wie das aus den Untersuchungen über die Wirkung des Zuckers bei Ermüdung hervorgeht.

Wenn nun, wie gewöhnlich bei dergleichen Versuchen, der Zucker in ein oder zwei Gaben täglich gegeben wird, so wird der Kreislauf ein oder zweimal am Tage förmlich mit Zucker überschwemmt, wodurch ein Teil dieses Zuckers bald oxydiert wird, denn der Stoffwechsel steigt wenn vielleicht verbrennbares Material in der Zirkulation vorhanden ist. Demzufolge wird für die übrigen Tageszeiten zu wenig Zucker übrigbleiben und das Tier wird mehr Eiweifs verbrauchen als sich nach dem Verbrennungswerte des dargereichten Zuckers erwarten liefs.

Man wird mir vorwerfen, dafs ich ins Blaue hinein spekuliere und schon längst das Gebiet wo die Theorien durch Beobachtungen kontrolliert werden können, verlassen habe. Ich habe aber schon im voraus gesagt, dafs ich nicht beanspruche eine Theorie zu geben, sondern dafs ich nur beabsichtige zu zeigen, dafs die Versuche Eykmanns mit Kartoffelstärke und Milchzucker, an deren Richtigkeit ich niemals gezweifelt habe, uns noch nicht zu dem Schlusse zwingen, dafs die Entstehung der Hühnerpolyneuritis an bestimmten Sorten von Stärke in der Nahrung gebunden (das heifst also: ohne Gegenwart dieser unmöglich) ist. Meine Versuche aber, besonders die mit Fleisch, sprechen gegen solche Auffassung[1]).

Gerade durch die Befunde Eykmans, dafs die von mir entdeckte Eigenschaft des ungeschälten Reises, durch Erhitzen in Dampf von 120° von einem geeigneten Hühnernährmittel in ein ungeeignetes verwandelt zu werden, allen Gramineen anzuhaften scheint, da ich dieselbe schon bei Phaseolus radiatus und bei Fleisch gefunden hatte, bekommen diese Tatsachen eine viel allgemeinere Bedeutung. Denn nicht nur für die Pathologie der Hühner, sondern für die allgemeine Physiologie der Nahrungs-

1) Wenn unter tausend mit stärkefreier Nahrung gefütterten Hühnern auch nur ein einziges an der Polyneuritis erkrankte, so wäre doch der Nachweis geführt, dafs die Krankheit unabhängig von Stärkegegenwart auftreten kann, also nicht an die Anwesenheit bestimmter Stärkearten gebunden ist. Und man müfste schon dann, wofern man die Hühnerpolyneuritis als einheitlichen Krankheitsbegriff wahren wollte, ihre Abhängigkeit von Stärke verneinen.

mittel und für die Ätiologie der Krankheiten, die mit der Ernährung im Zusammenhange stehen, wie Scorbut, Pellagra, Beriberi, wird das weitere Studium wichtige Anhaltspunkte geben. Dabei ist es aber nicht gleichgültig, ob die schädigende Wirkung einer bestimmten Nahrung gewissen darin befindlichen Substanzen (bzw. im Darmkanal daraus entstehenden Giften) zuzuschreiben oder aber ob sie auf das Fehlen von für das Leben oder die Gesundheit unentbehrliche Stoffe zurückzuführen sei. Denn im ersteren Falle wäre es rationell, das betreffende Mittel aus der Diät zu streichen, im letzteren ist man gewifs, durch geeigneten Zusatz den Mangel heben zu können.

Die Milchleukozytenprobe nach Trommsdorff.

Von

R. Schuppius,
cand. med. der Kaiser-Wilhelms-Akademie.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Rubner.)

Im 12. Heft des Jahrgangs 1906 der Münchener Medizinischen Wochenschrift veröffentlichte Dr. Trommsdorff in München unter dem Titel »Die Milchleukozytenprobe« eine Arbeit, in der er angab, ein Verfahren gefunden zu haben, nach dem es möglich sein sollte, »den Leukozytengehalt der Milch ganz exakt festzustellen«.

Das Verfahren ging zurück auf eine Arbeit von Bergey in Philadelphia, die 1904 unter dem Titel »Source and nature of bacteria in milk« erschienen war. Danach hatte Bergey je 10 ccm der zu untersuchenden Milch zentrifugiert, den Bodensatz mit Chloroform entfettet und dann im Deckglasausstrichpräparat gefärbt betrachtet. Fand er in einem Gesichtsfeld mehr als 10 Leukozyten, so nahm er eine pathologische Eiterbeimengung in der Milch an.

Das grundlegende Prinzip bei der Methode Trommsdorffs bestand darin, dafs er »eine genau gemessene, relativ kleine Menge Milch mit einer guten Zentrifuge in einem Gläschen ausschleuderte, das unten in eine geeichte Kapillare ausläuft. Die Kapillareichung gestattet genau Mengen von 0,001 bis 0,02 ccm in Abständen von je 0,001 bequem abzulesen. Für die grofse

Praxis konstruierte er Röhrchen, die »einfach an dem etwas ausgezogenen Ende des Zentrifugengläschens zwei Marken (1 und 2 entsprechend einem Leukozytengehalt von 1 bzw. 2 ‰) tragen«.

Wurde die Milch in diesen Röhrchen auf einer gut laufenden Zentrifuge mit einer Umdrehungszahl von etwa 1200 in der Minute durch mehrere Minuten zentrifugiert, so sah man »in dem Bodenteil der Röhrchen einen gelblichen Bodensatz (Leukozyten) und konnte den Volumengehalt an Leukozyten direkt ablesen«.

Die Ergebnisse waren, wie Trommsdorff zusammen mit Dr. Rullmann im Oktoberheft 1906 des »Archiv für Hygiene« näher ausführt, folgende:

Die Milch wurde unter Wahrung peinlicher Sauberkeit im Stall von jeder Kuh einzeln entnommen und möglichst bald im Laboratorium untersucht. Es betrug dann der Leukozytengehalt im Mittel 0,2 bis 0,4 ‰. In den Fällen, in denen er 1 ‰ erreichte oder gar überstieg, was von 333 insgesamt untersuchten Kühen bei 57, also bei 17% der Fall war, ergab die bakteriologische Untersuchung der Milch einen grofsen Reichtum an Streptokokken. Daraus folgerte Trommsdorff das Bestehen einer chronischen Streptokokkenmastitis bei der die Milch liefernden Kuh und eine durch diese Erkrankung verursachte pathologische Eiterbeimengung in der Milch. Er glaubte also annehmen zu dürfen, dafs seine »Milcheiterprobe« einen untrüglichen Schlufs auf die Menge der in der Milch vorhandenen Leukozyten, nach seiner Auffassung also auch gleichzeitig des Eiters, und das Bestehen der chronischen Streptokokkenmastitis zuliefs.

Bei diesen Angaben war mir zunächst auffallend erschienen, dafs nach Trommsdorff der ganze Bodensatz aus Leukozyten bestehen sollte, während Bergey, dessen Verfahren gegenüber dem Trommsdorffs doch keine prinzipiellen Unterschiede aufwies, sein Zentrifugat vor der mikroskopischen Betrachtung erst mit Chloroform entfetten mufste. In dieser Richtung glaubte ich zuerst noch aufklärende Versuche anstellen zu müssen.

Zur allgemeinen Orientierung über die Verhältnisse des Milchbodensatzes erschien es mir vorerst genügend, die Gesamt-

mischmilch eines Stalles zu untersuchen, da das Verfahren bei Anwendung der grob graduierten Röhrchen ja auch für die grofse Praxis von Nutzen sein sollte.

Da nach den Ermittelungen Trommsdorffs in München 17% aller untersuchten Kühe einen Leukozytengehalt von 1 ‰ und mehr in der Milch zeigten, konnte für Berlin angenommen werden, dafs, bei einer verhältnismäfsig gleichen Anzahl mastitiskranker Kühe, die Mischmilch eines Stalles einen Leukozytengehalt von wenigstens 0,2 bis 0,3 ‰ aufweisen müfste.

Von der zu untersuchenden Milch wurden genau nach den Angaben Trommsdorffs je 10 ccm in die Röhrchen gefüllt und auf einer Handzentrifuge, deren Umdrehungszahl vorher festgestellt war, mit 1200 bis 1300 Umdrehungen in der Minute 2 Minuten lang zentrifugiert. Dann zeigte sich in dem Kapillarteil der Röhrchen tatsächlich ein Bodensatz bis zur Höhe des Teilstriches für 0,3 bis 0,4 ‰, der aber im Gegensatz zu den Resultaten Trommsdorffs, statt gelblich, mehr graugrün gefärbt war.

Von diesem Bodensatz wurde nach vorsichtiger Entfernung der Milch eine Probe mittelst einer ausgeglühten Platinnadel auf ein Deckglas gebracht, mit Methylenblau gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet. Dann fiel sofort ein grofser Reichtum des Bodensatzes an Fett auf, ein Befund, der bei allen Präparaten mit absoluter Regelmäfsigkeit wiederkehrte. Dagegen waren Leucozyten nur in verhältnismäfsig sehr geringer Anzahl zu entdecken.

Es wurde nun versucht, den ungefähren Fettgehalt des Bodensatzes zu ermitteln. Der zu dem Zweck anfänglich unternommene Versuch, durch Ausschütteln der Milch mit Chloroform und nachfolgendes Zentrifugieren zum Ziel zu kommen, führte zu keinem Resultat, da die Kapillaren von Chloroformtröpfchen verstopft wurden.

Es wurde darum folgender Weg eingeschlagen: Zwei Röhrchen mit je 10 ccm Milch wurden unter den obengenannten Bedingungen zentrifugiert, dann aus dem einen die Milch vorsichtig abgegossen, das Röhrchen wieder mit Äther gefüllt, der Boden-

satz mit der Platinnadel kräftig aufgerührt und abermals zentrifugiert. Der neu gewonnene Bodensatz stand dann in der Kapillare annähernd halb so hoch wie in dem Kontrollröhrchen. Es mufste also der Bodensatz erhebliche Mengen von Fett enthalten.

Um sicher zu gehen, wurde der Versuch noch in folgender Weise variiert:

Eine gröfsere Menge Milch wurde mit Äther kräftig durchgeschüttelt und stehen gelassen. Nach einigen Stunden, als sich der Äther genügend von der Milch gesondert hatte, wurde die obere Schicht vorsichtig abgesogen, von der entfetteten Milch 10 ccm in ein Zentrifugenröhrchen abgegossen und dieses zugleich mit einem Kontrollröhrchen mit gewöhnlicher Milch in der üblichen Weise zentrifugiert. Auch hier ergab sich, dafs die Bodensätze von entfetteter und gewöhnlicher Milch sich dem Volumen nach annähernd wie 1 : 2 verhielten.

Um weiterhin festzustellen, ob etwa noch andere, fremdartige Bestandteile in dem Bodensatz sich fänden, wurde dieser zunächst einer genaueren makroskopischen Betrachtung unterzogen, und es zeigte sich, dafs er aus zwei, wenn auch nicht deutlich getrennten Teilen bestand, einem oberen, ziemlich lockeren und einem unteren, dichteren, anscheinend fest zusammengeballten.

Von der oberen Schicht wurden bei normalem wie bei entfettetem Bodensatz Deckglasausstrichpräparate angefertigt und ungefärbt betrachtet. Es fanden sich darin aufser den gewöhnlichen Fetttröpfchen sehr vereinzelte Leukozyten, daneben aber grünlichgelb gefärbte Bröckchen von Kuhkot, Haare bis zur Länge von ca. 2 mm und eine grofse Anzahl Bakterien der verschiedensten Arten.

Den unteren Teil des Bodensatzes gelang es in einigen Fällen mittels der Platinnadel in toto heraus- und auf den Objektträger zu bringen. Die mikroskopische Betrachtung zeigte dann sofort, dafs der ganze Klumpen aus breiten, platten, vielfach um ihre Längsachse gedrehten, vegetabilischen Fasern, offenbar also aus Baumwolle bestand, die wohl infolge des Durchseihens durch

baumwollene Tücher in die Milch gelangt war. Leukozyten waren zwischen den Fasern nicht zu finden.

Es war also der Nachweis geliefert, dafs der Bodensatz der untersuchten Mischmilch trotz seines verhältnismäfsig grofsen Volumens nur wenig Leukozyten, dagegen sehr viel fremdartige Bestandteile enthielt.

Dieselben Versuche wurden nun mit einer Milch angestellt, die direkt von der Kuh entnommen war. Zu dem Zweck wurden in einem, unter kreistierärztlicher Kontrolle stehenden Stall, unter Beachtung der vom hiesigen Polizeipräsidium erlassenen Vorschriften — sorgfältige Reinigung der Hände des Melkers und Abspritzen der ersten Milch jedes Striches — von neun Kühen Milchproben direkt in vorher sterilisierte Glaskölbchen abgemolken und möglichst bald im Laboratorium untersucht bzw. auf Eis gelegt.

Beim Zentrifugieren unter den obengenannten Bedingungen ergab sich dann ein Bodensatz, dessen Höhe nach Mafsgabe der Kapillareichung zwischen 0,1 und 0,3 ‰ schwankte.

Eine Behandlung dieses Bodensatzes in der oben angegebenen Weise — übergiefsen mit Äther, umrühren und zentrifugieren — ergab einen sehr hohen Gehalt an Fett, wie aus folgender Tabelle ersichtlich wird:

Bodensatz in ‰.

Nr.	normal	entfettet	Bemerkungen
I	0,1	Spur	
II	0,3	0,05	
III	0,2	0,1	
IV	0,1	Spur	
V	0,1	—	blutig gefärbt
VI	0,2	0,1	
VII	0,1	Spur	
VIII	0,1	Spur	
IX	0,3	—	etwas gelblich

Im allgemeinen erschien bei diesen Proben der Fettgehalt des Bodensatzes etwas höher als bei der vorher untersuchten Mischmilch des ganzen Stalles; dafür traten, wie es bei der vor-

sichtigen Entnahme der Milch ja auch nicht anders zu erwarten war, die sonstigen fremden Beimischungen etwas in den Hintergrund. Zwar fanden sich Haare bis zur Länge von 2 mm auch hier fast in jedem Zentrifugat, aber Kuhkot war nur in relativ sehr geringen Mengen vorhanden, und die in der Gesamtmischmilch gefundenen Baumwollfasern fielen natürlich ganz weg.

In der Probe 5, deren Bodensatz von vornherein durch seine blutig rote Farbe aufgefallen war, fanden sich ziemlich reichlich rote Blutkörperchen — bis zu 10 im Gesichtsfeld bei Betrachtung mit $^1/_{12}$ Ölimmersion —, so dafs es scheint, dafs auch diese bei der Bildung des Bodensatzes eine gewisse Rolle zu spielen geeignet sind.

Die Untersuchung von mit Methylenblau gefärbten Ausstrichpräparaten der Bodensätze ergab in allen Fällen einen im Verhältnis zu der Stallmischmilch überraschend hohen Gehalt an Leukozyten. Wenngleich nun deren Menge nach Trommsdorff durchaus noch nicht pathologisch war, so erschien es doch angebracht, die Leukozyten genauer zu untersuchen, da immerhin die Möglichkeit vorlag, dafs eine Eiterung zu ihrem zahlreichen Auftreten in der Milch den Anlafs gegeben haben könnte.

Diese Untersuchung geschah durch Färbung von Deckglasausstrichpräparaten der Bodensätze nach dem Verfahren von May-Grünwald. Dann stellte sich heraus, dafs die Leukozyten zum gröfsten Teil solche mit eosinophilen Granulationen waren. Die wenigen anders gearteten, meist Lymphozyten, selten auch Myelozyten, spielten im Vergleich zu ihnen keine Rolle. Da nun nach Klemperer[1]) die Eiterkörperchen zum überwiegend gröfsten Teil Leukozyten von basophilem multinukleärem Typus sind, konnte angenommen werden, dafs die in der Milch gefundenen eosinophilen Zellen nicht auf eine Eiterung hindeuten. Dagegen ist es wohl möglich, dafs das Auftreten eosinophiler Zellen in der Milch in einem gewissen Zusammenhang mit dem Stadium der Laktation steht. Wenigstens sagt Stöhr[2]) bezüglich der

1) v. Mehring, Lehrbuch der inneren Medizin, 3. Aufl., S. 1003.
2) Stöhr, Histologie, 2. Aufl., S. 346.

Verhältnisse beim Menschen, dafs vor Beginn der Laktation das interstitielle Bindegewebe der Milchdrüse mit reichlichen eosinophilen Zellen infiltriert ist, die während der Laktation allmählich daraus verschwinden, also höchst wahrscheinlich doch in die Milch übergehen. Tatsächlich waren auch im vorliegenden Falle, nach Aussage des Besitzers, mehrere von den untersuchten Kühen erst ganz vor kurzem in eine neue Laktationsperiode eingetreten.

Es war nun nach allen diesen Ergebnissen als erwiesen anzusehen, dafs ein durch Zentrifugieren der Milch erhaltener Bodensatz nicht notwendig aus reinen Leukozyten bestehen müsse.

In zweiter Linie mufste sich nun die Untersuchung darauf richten, ob ein wirklich erzielter, aus Leukozyten bestehender Bodensatz einen sicheren Schlufs auf die Menge des der Milch beigemengten Eiters zuläfst, da doch eine einfache Überlegung ergibt, dafs Eiter je nach den Umständen bald mehr, bald weniger Leukozyten enthält.

Da zu den dazu nötigen Versuchen Eiter von mastitiskranken Kühen leider nicht zur Verfügung stand, mufste menschlicher Eiter benutzt werden, dessen Entnahme aus der Chirurgischen Poliklinik der Charité Herr Prof. Dr. Pels-Leusden in liebenswürdiger Weise gestattete.

Es wurden znnächst 500 ccm Milch mit je 1 ccm Eiter von einem phlegmonösen Panaritium versetzt, so dafs die Milch einen Eitergehalt von 2 ‰ besafs, der Kolben mit der Milch 5 Minuten tüchtig geschüttelt, bis sich der Eiter gleichmäfsig fein verteilt hatte, 10 ccm von der Mischung in ein Zentrifugierungsröhrchen abgegossen und dieses zusammen mit einem Kontrollröhrchen mit normaler Milch unter den gewohnten Bedingungen zentrifugiert.

Dann zeigte sich in dem Röhrchen mit der Eitermilch ein Bodensatz von 0,9 ‰, in dem Kontrollröhrchen ein solcher von 0,3 ‰. Da nach den oben angegebenen Untersuchungen der Bodensatz der Mischmilch fast gar keine Leukozyten enthält, mufste man von 0,9 ‰ noch 0,3 abziehen, um die wirkliche Leukozytenmenge = 0,6 ‰ zu erhalten. Um dem Einwurf zu begegnen, dafs die Zentrifugierung nicht lange genug fortgesetzt

worden sei, wurden versuchsweise zwei Röhrchen mit derselben Mischung die doppelte Zeit zentrifugiert, ohne dafs das Resultat sich von dem vorigen in erheblicher Weise unterschieden hätte. Es ergab sich also endgültig bei einer Milch, die 2 ‰ Eiter enthielt, ein Bodensatz von weniger als 1 ‰ Leukozyten.

Um aber zu wirklich einwandfreien Resultaten bezüglich des Leukozytengehalts des Eiters zu kommen, mufste die Fehlerquelle ausgeschaltet werden, die vielleicht in der künstlichen Mischung der Milch mit Eiter liegen könnte, und dazu wurde eine Untersuchung eines Gemenges von Eiter und physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen, um einen Bodensatz zu erhalten, der aus nichts anderem als Leukozyten bestehen konnte.

Es wurden im selben Verhältnis von 2 ‰ Gemenge einer frisch bereiteten und filtrierten physiologischen Kochsalzlösung mit Eiter von demselben Panaritium wie oben, dann von einem Drüsenabszefs und einer Mastitis hergestellt und in den Kapillarröhrchen zentrifugiert. Dann ergab sich bei dem Panaritiumeiter nach 2 Minuten ein Bodensatz von 1 ‰. Bei den anderen Eiterarten, die beide sehr dickflüssig waren, mufste die Zentrifugierung etwas länger fortgesetzt werden, und es zeigte sich bei dem Drüseneiter ein Bodensatz von 1,7 ‰, während bei dem Mastitiseiter der Bodensatz merkwürdigerweise weit über den obersten Teilstrich der Kapillare hinausging. Da aber bei der Herstellung des Gemenges mit grofser Sorgfalt verfahren war, mufste hieraus gefolgert werden, dafs der Inhalt der Kapillare kleiner war als 0,02 ccm, dafs also die Graduierung nicht richtig sein konnte. Aufserdem resultierte aber aus diesen Ergebnissen, dafs verschiedene Eiterarten auch verschiedenen Leukozytengehalt besitzen, dafs es also nicht angängig ist, mit Trommsdorff Leukozyten gleich Eiter zu setzen und einfach aus der Menge der Leukozyten auf die Menge des Eiters zu schliefsen.

Um schliefslich noch den Inhalt der Kapillaren genauer zu ermitteln, wurde auch auf folgende Weise verfahren:

Die Röhrchen wurden im Trockenschrank längere Zeit erhitzt, um jede Feuchtigkeit zu beseitigen, und dann genau gewogen. Hierauf wurden die Kapillaren bis zum Teilstrich 2

mit gereinigtem Quecksilber gefüllt und die Röhrchen abermals gewogen. Die Differenz der beiden Gewichte ergab das Gewicht der in der Kapillare enthaltenen Quecksilbersäule. Bei Division dieser Zahl durch das spezifische Gewicht des Quecksilbers unter Berücksichtigung der Temperatur ergab sich das Gewicht der gleichen Wassermenge und damit der Inhalt der Kapillaren. Die Resultate waren folgende:

Bei den fein graduierten Röhrchen, bei einer Temperatur von 22° C und einem spezifischen Gewicht des Quecksilbers = 13,54:

Nr.	Gewicht des Röhrchens allein g	mit Hg g	Gewicht d. Hg. g	Vol. i. ccm
I	9,86	10,03	0,17	0,0125
II	9,53	9,71	0,18	0,0133
III	8,62	8,80	0,18	0,0133
IV	8,72	8,92	0,20	0,0148
V	10,00	10,16	0,16	0,0118
VI	9,39	9,57	0,18	0,0133
VII	9,81	9,98	0,17	0,0125

Für die grob graduierten Röhrchen ergab sich bei einer Temperatur von 19° C und dem spezifischen Gewicht des Quecksilbers = 13,549:

Nr.	Gewicht des Röhrchens allein g	mit Hg g	Gewicht d. Hg. g	Vol. i. ccm
I	8,38	8,58	0,20	0,0147
II	9,40	9,58	0,18	0,0132
III	8,09	8,27	0,18	0,0132
IV	8,02	8,21	0,19	0,0140
V	8,46	8,65	0,19	0,0140
VI	9,18	9,37	0,19	0,0140

Demnach war der Inhalt sämtlicher Kapillaren verschieden und blieb 0,005 bis 0,008 ccm hinter der angegebenen Zahl 0,02 zurück.

Es läfst sich also das Endresultat der vorliegenden Untersuchungen folgendermafsen formulieren:

I. Die Graduierung der von Trommsdorff angegebenen, im Handel erhältlichen Zentrifugierungsröhrchen ist nicht genau; der Inhalt ihres Kapillarteils erreicht statt 0,02 im besten Falle 0,0148 ccm.

II. Ein durch Zentrifugieren von Milch in Trommsdorffs Kapillaren erhaltener Bodensatz besteht zum grofsen Teile — manchmal bis zu 50 Vol. Proz. und darüber — aus Fett. Aufserdem finden sich darin Kuhkot, Haare, rote Blutkörperchen u. a. m., dagegen relativ wenig Leukozyten, die aber nicht von einer Eiterung herrühren, da sie zum gröfsten Teil solche mit eosinophilen Granulationen sind.

III. Aus der Menge der Leukozyten im Bodensatz läfst sich nicht auf die Menge des der Milch beigemengten Eiters schliefsen, da der Leukozytengehalt verschiedener Eiterarten verschieden ist.

Zum Schlufs sei es mir gestattet, Herrn Geheimrat Prof. Dr. Rubner für seine liebenswürdige Unterstützung und Förderung bei meinen Untersuchungen meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Das spez. Gewicht gekochter und roher Fleischsorten.

Von

Dr. Nawiasky,
Assistenten am Institut.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin.
Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. M. Rubner.)

Bei den Untersuchungen über das Eindringen der Wärme in feste Objekte und Organteile hat Prof. Rubner darauf hingewiesen, dafs nur wenige Versuche vorliegen, aus denen man Angaben über das spezifische Gewicht des Fleisches zu entnehmen in der Lage sei.[1]) Derartige Feststellungen haben namentlich hinsichtlich der Bestimmung der spezifischen Wärme des Fleisches Bedeutung und können auch für einige physiologische Überlegungen Interesse beanspruchen.

Ich habe daher auf Anregung von Prof. Rubner eine Reihe von Messungen ausgeführt. Das zu prüfende Material — Rindfleisch, Kalbfleisch, roher Schinken, gekochter Schinken — wurde sorgfältig von anhaftendem Fett befreit, dann zu Trocken- und Fettbestimmung von der Substanz weggenommen.

Die Bestimmung des spezifischen Gewichts wurde mit der Westphalschen Wage ausgeführt, deren einer Wagebalken für diese Zwecke bekanntlich ein kleines Glaskörbchen, in welches die Substanzen eingelegt werden, trägt. Man mufs möglichst

1) Arch. f. Hyg., Bd. LV, S. 239.

rasch arbeiten, damit ein Ablösen von Substanz durch das Wasser vermieden wird. Dies läfst sich auch erreichen.

Die Fleischstücke wurden dann an einem Draht in einem Glaskolben mit Verschlufs aufgehängt und bei 100° im Dampfkochtopf (1 Stunde) erwärmt, die Stücke mit Fliefspapier abgetrocknet und wieder zur Bestimmung des spezifischen Gewichts verwendet. Kleinere Stücke als 100 g wiegende wurden nicht verwandt.

Die Rindfleisch-Kalbfleischproben waren sehr mageres Fleisch, beim Schinken konnten nicht gleich fettarme Proben erhalten werden. Immerhin gehören die ausgewählten Proben nicht zu solchen mit hohem Fettgehalt.

In nachstehender Tabelle habe ich die erhaltenen Werte zusammengestellt.

Übersicht über die Versuche.

Nr.	Abnahme %	Spez. Gewicht I	Spez. Gewicht II	Fettgehalt %	Trockensubstanz %	
1.	47,547	1,0648	1,1049	1,816	26,298	Rindfleisch
2.	45,009	1,0676	1,1034	0,964	25,63	
3.	48,661	1,0670	1,0999	0,8275	23,677	
4.	52,321	1,0547	1,0883	2,1102	22,640	
5.	48,360	1,0550	1,1060	1,1969	23,264	Kalbfleisch
6.	49,073	1,0640	1,1072	0,8890	22,438	
7.	45,920	1,0683	1,1002	1,3230	22,530	
8.	45,877	1,0704	1,1056	0,9874	22,791	
9.	43,626	1,1192	1,1246	4,8469	38,806	Roher Schinken
10.	43,471	1,1003	1,1691	8,2234	37,246	
11.	44,035	1,1170	1,1452	10,772	43,304	
12.	45,094	1,1704	1,1631	3,5555	37,753	
13.	14,606	1,1157	1,1157	5,0959	39,876	Gekocht. Schinken
14.	31,068	1,0877	1,1150	6,0612	33,928	
15.	31,314	1,1264	1,1105	5,7938	40,034	
16.	18,095	1,0842	1,0758	10,554	41,930	

Man sieht, die Ergebnisse sind sehr gleichartig. Ich bilde daher die Mittelzahlen.

Spez. Gewicht.

	Frisch	nach Erhitzen auf 100°	Gewichts-abnahme
Rindfleisch	1,0635	1,0991	48,38
Kalbfleisch	1,0644	1,1047	47,30
Roher Schinken . . .	1,1267	1,1455	44,05
Gekochter Schinken. .	1,1035	1,1042	23,77

Daraus folgt: Mageres Rindfleisch gibt im Mittel 1,0635 spezifisches Gewicht, der Wert ist etwas höher als der von Rubner gefundene mit 1054, aber kleiner als jener von Glan = 1,070. — Es hängt dies natürlich mit Verschiedenheiten des Fettgehaltes zusammen. Zwischen Rind- und Kalbfleisch ist kein Unterschied zu finden. Dagegen zeigt sich beim rohen wie gekochten Schinken ein weit gröfseres spezifisches Gewicht. Bei rohem Schinken hängt das mit dem Verlust von Wasser beim Einsalzen und dem Übertritt von Kochsalz zusammen.

Die Erhitzung auf 100° bringt folgende Unterschiede: bei Rindfleisch nimmt das spezifische Gewicht zu, wie dies auch Rubner angegeben hat. Ähnlich bei Kalbfleisch. Die Differenzen sind:

	Rindfleisch	Kalbfleisch
	1,0991	1,1047
	1,0635	1,0644
Differenz:	0,0356	0,0403

Immerhin ist bemerkenswert, dafs sich das spezifische Gewicht bei Kalbfleisch etwas mehr ändert, zumal gerade Kalbfleisch etwas weniger an Gewicht bei Erhitzen einbüfst. Demnach müssen kleine Unterschiede bei beiden mit Rücksicht auf die Art der beim Kochakt austretenden Stoffe vorhanden sein.

Roher Schinken ändert sich beim Erhitzen nur um wenig im spezifischen Gewicht, wie es auch sich weniger am Gewichtsverlust erkennen läfst. Dies steht im Einklang mit Experimenten,

welche Nothwang im hiesigen Laboratorium ausgeführt hat. (Archiv f. Hyg. Bd. XVIII, S. 80.) Beim Salzen wird bereits Wasser abgegeben, bei der durch Schrumpfen eintretenden Volumveränderung macht sich dieser frühere Wasserverlust geltend. Die nachfolgende Kochung presst weniger Bestandteile aus bzw. verdrängt einen Teil des früher aufgenommenen Kochsalzes. Interessant ist in dieser Hinsicht der gekochte Schinken; er sollte gar keine Änderung seiner Verhältnisse zeigen. Tatsächlich nimmt er an Volum und Gewicht ab. Damit ist bewiesen, dafs der Schinken vorher nicht auf 100° erhitzt worden sein kann. Man kann also diese Methodik benützen, um nachträglich festzustellen, welche Temperaturen der Schinken früher bei der Erwärmung erreicht hatte. Trotz der Volumverminderung zeigt sich bei dem gekochten Schinken keine Anderung des spezifischen Gewichts.

Man sieht beim Vergleich der nach der Erhitzung auf 100° erhaltenen Zahlen, dafs im gekochten Zustande der Fleischsorten die Differenzen im spezifischen Gewicht sehr kleine sind.

Nach mancher Richtung könnte es wünschenswert sein, den Einflufs des Fettes, der ja natürlich für das mittlere spezifische Gewicht Bedeutung haben mufs, durch Rechnung zu eliminieren.

Für das frische Fleisch gebe ich nachstehend eine Zusammenstellung.

Umrechnung auf fettfreies Fleisch.

Nr.	Spez. Gewicht I	Mittel	Nr.	Spez. Gewicht I	Mittel
1.	1,0695	1,0671	9.	1,1367	1,1526
2.	1,0701		10.	1,1286	
3.	1,0691		11.	1,1588	
4.	1,0599		12.	1,1862	
5.	1,0579	1,0672	13.	1,1338	1,1263
6.	1,0663		14.	1,1066	
7.	1,0716		15.	1,1484	
8.	1,0730		16.	1,1186	

Sie zeigt bei Rindfleisch und Kalbfleisch erst Unterschiede in der dritten Dezimale:

1.0671	1,0672
1,0635	1,0644
0,0036	0,0028

Gröſser ist der Unterschied bei dem Schweinefleisch, das einen höheren Fettgehalt hatte.

1,1526	1,1263
1,1267	1,1035
0,0259	0,0228

Für Betrachtungen über die Wärmeleitung sind aber auch diese Unterschiede belanglos.

Beitrag zur Biologie des Bacillus faecalis alcaligenes.

Von

Dr. Walter Gaehtgens.

(Aus dem hygienisch-bakteriologischen Institut zu Strafsburg i/Els.
Direktor: Prof. Dr. Forster.)

Die im Jahre 1904 von Altschüler[1]) veröffentlichte und in der Folge von Doebert[2]) bestätigte Mitteilung, dafs es ihm gelungen sei, einen Typhusbazillus in einen faecalis alcaligenes und umgekehrt einen Alkaligenes in ein die biologischen Eigenschaften des Eberthschen Stäbchens aufweisendes Bakterium umzuzüchten, war geeignet, das allgemeine Interesse in Anspruch zu nehmen. Wäre doch durch diese Feststellung nicht allein die Möglichkeit eröffnet, die Entstehungsursache des Typhus abdominalis in einer Reihe ätiologisch unklarer Fälle zu erklären, sondern auch die Lehre von der Spezifität der Bakterienarten stark in Mitleidenschaft gezogen worden. Es war daher nur natürlich, dafs von verschiedenen Seiten Nachprüfungen vorgenommen wurden, durch welche die obigen Ergebnisse indessen nicht bestätigt werden konnten. Diese Nachuntersuchungen ergaben einerseits, dafs die von Altschüler und Doebert benutzten Stämme nicht Reinkulturen gewesen waren, wodurch sich mit grofser Wahrscheinlichkeit ihre auffälligen Resultate erklären liefsen, anderseits, dafs eine Umwandlung der Typhus- und Alkaligenesbazillen im Sinne der beiden Autoren beim Arbeiten

mit einwandfreien Reinkulturen nicht erfolge. Aus der Altschülerschen in Typhus umgewandelten Alkaligeneskultur vermochte Conradi[3]) 3 verschiedene Stäbchenarten zu isolieren, die, nach seiner Angabe, mit den Wesenseigenschaften des Typhusbazillus nichts gemein hatten, Boit[4]) aber nur 2, einen typhusähnlichen Bazillus und den Alkaligenes. Dagegen vermochte Berghaus[5]) aus dem von Doebert benutzten Stamm nur Typhus- und Alkaligenesbazillen zu züchten. Er und, unabhängig von ihm, Trommsdorff[6]) nahmen auch eine Nachprüfung der Doebertschen Versuche vor, ohne indes seine Ergebnisse bestätigen zu können. Die weiteren eingehenden Untersuchungen von Berghaus[7]) brachten dann neue interessante Aufklärungen über die Lebenseigenschaften des Alkaligenes, welche für die Begutachtung von Fäkalisreinkulturen erhöhte Sicherheit bieten und zugleich die Spezifität des Petruschkyschen Bazillus aufser Frage stellen. Indessen blieb vorläufig die Frage ungelöst, ob in der Tat die Annahme, dafs Altschüler nicht von Reinkulturen ausgegangen wäre, genüge, um seine auffälligen Befunde zu erklären. Auf Anregung und unterstützt von Hrn. Prof. Forster habe ich die Altschülerschen Versuche in eingehender Weise nachgeprüft und insbesondere durch Beobachtung und gleichzeitige Züchtung von Typhus- und Alkaligenesbazillen in einem gemeinsamen Nährsubstrat Anhaltspunkte dafür zu finden gesucht, ob und unter welchen Bedingungen ein Überwuchern der einen oder der anderen Bakterienart stattfindet, wodurch sich der Irrtum Altschülers vielleicht erklären liefse. Zu diesem Zwecke nahm ich zunächst in der von Altschüler angegebenen Weise die Züchtung der Typhus- und Alkaligenesbazillen vor.

Altschüler brachte möglichst sterile Plazentastückchen von ungefähr 8 ccm Inhalt in sterilisierte Kölbchen, welche, um einem zu schnellen Eintrocknen vorzubeugen, etwas physiologische Kochsalzlösung enthielten. Auf die Plazentastücke wurden dann Koli-, Typhus- und Paratyphusbazillen (A und B) übergeimpft und sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei 37° C fortgezüchtet. Alle 8 Tage wurden die genannten Bakterienarten durch Ausstrich auf v. Drigalski-Conradiplatten geprüft.

Während bei diesen über mehrere Wochen fortgeführten Untersuchungen sich die Koli- und Paratyphusbakterien dauernd unverändert zeigten, traten bei 2 der benutzten Typhusstämme auffällige biologische Veränderungen ein. Der eine verlor nach $4^1/_2$ Wochen die Agglutinationsfähigkeit, bläute nach 24 Stunden Lackmusmolke und bildete auf Kartoffel einen gelblichen Belag. Bei dem zweiten liefs sich die gleiche Erscheinung nach sechs Wochen beobachten. Die derart veränderten Bazillen schlugen nach 3 resp. $4^1/_2$ Wochen wieder um, indem sie Lackmusmolke 3 Tage lang säuerten und erst vom vierten Tage ab wieder Alkali bildeten. Nicht minder merkwürdig war das Verhalten einer Alkaligenesagarkultur, von welcher, ohne weiterzuimpfen, alle 8 Tage Proben in Lackmusmolke und auf Kartoffeln geprüft wurden. Nach 4 Wochen wurde dieser Stamm von einem hochwertigen Typhusimmunserum agglutiniert; nach 6 Wochen säuerte er Lackmusmolke schwach und liefs sie klar; nach 8 Wochen schliefslich zeigte er, gleich dem Typhusbazillus, auf Kartoffel unsichtbares Wachstum. Der Faecalis alcaligenes hätte sich also dermafsen verändert, dafs er mit den gewöhnlichen Methoden von einem echten Typhusbazillus nicht zu unterscheiden war. Altschüler nimmt an, dafs die bacilli faecales alcaligenes keine Einheit bilden, weil ihm diese Umwandlung nur einmal gelang, ein Schlufs, der an sich, wenn auch aus anderen Gründen, richtig ist.

Nach dem von Altschüler angegebenen Verfahren habe ich zunächst einen aus dem Blute eines Typhuspatienten gezüchteten Typhusstamm, sowie 3 Alkaligenesstämme eingehend geprüft. Von allen 4 bei Zimmertemperatur und 37° C sowohl auf sterilen Plazentastückchen, als auch auf Agar gezüchteten Stämmen wurden wöchentlich Proben in Lackmusmolke, Traubenzuckerbouillon und auf Kartoffel übergeimpft, sowie ihr Verhalten gegenüber einem hochwertigen Typhusimmunserum geprüft. Das Ergebnis dieser Untersuchungen nach 8 Wochen war, dafs eine Umwandlung der Bakterien im Sinne Altschülers nicht stattgefunden hatte. Ebensowenig konnte ich, wie schon an anderer Stelle[8]) mitgeteilt ist, an 50 Typhus-

stämmen, welche $1^1/_2$ bis 3 Jahre in zugeschmolzenen Röhrchen bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden waren, eine Veränderung feststellen.

Nachdem es Berghaus gelungen ist, die Resultate Doeberts durch die Züchtung von Typhus- und Alkaligenesstäbchen aus dem von diesem benutzten Fäkalisstamm zwanglos zu erklären, liegt die Annahme des gleichen Zusammentreffens auch für die Altschülerschen Untersuchungen am nächsten. Obwohl dieser Nachweis weder Conradi noch Boit gelungen ist, kann man diese Möglichkeit um so weniger von der Hand weisen, da sich beide Autoren zur Prüfung der Altschülerschen Kultur lediglich der Lackmus-Milchzuckerplatten bedienten, welche für diesen Zweck wohl kaum genügen dürften. Da mir der von Altschüler benutzte Stamm leider nicht mehr zur Verfügung stand, mufste ich mich darauf beschränken, das Verhalten der beiden Bakterienarten in einem gemeinsamen Nährsubstrat zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke mufste ich mich nach einem Kulturmedium umsehen, welches die Differenzierungen der beiden Bakterien in leichter, übersichtlicher Weise ermöglicht. Die gewöhnlichen, im Laboratorium täglich gebrauchten Nährböden schienen mir dafür wenig geeignet zu sein. Zwar lassen sich nach einigen Tagen auf dem Lackmus-Milchzuckeragar und noch mehr auf der Gelatine deutliche Unterschiede zwischen den Typhus- und Alkaligeneskolonien erkennen, welche zur Differenzierung vereinzelter isolierter Kolonien mit Erfolg herangezogen werden können. Für das Arbeiten mit grofsen Bakterienmengen sind aber derartige Verschiedenheiten zu wenig ins Auge fallend, da unmöglich jede Kolonie einer eingehenden Prüfung unterzogen werden kann. Indessen mufsten für die Herstellung eines diesen Anforderungen genügenden Nährsubstrates die biologischen Eigenschaften der Typhus- und Alkaligenesbazillen hinreichenden Anhalt bieten.

Petruschky[9]), [10]), dem zuerst die Züchtung des Fäkalis aus einer Probe verdorbenen Bieres gelungen ist, gibt als ge-

meinsame Kennzeichen für den Typhusbazillus und den Alkalibildner an:

1. Lebhafte Beweglichkeit in geeignetem Nährboden;
2. vollständiger Kranz von Geifseln bei Färbung nach Loeffler;
3. Entfärbung nach der Gramschen Methode;
4. Aussehen der Kolonien auf der Gelatineplatte;
5. Wachstum in Milch, ohne dieselbe zur Gerinnung zu bringen;
6. Wachstum in zuckerhaltigen Nährböden ohne Gasbildung;
7. negative Indolreaktion.

Als sichere Unterscheidungsmittel sind zu gebrauchen:

1. Wachstum in Lackmusmolke, welche der Alkaligenes zunächst trübt und dann alkalisch macht, während der Typhusbazillus dieselbe fast vollkommen klar läfst und leicht säuert.
2. Die Immunitätsreaktion mit Typhusserum nach Pfeiffer, welche der Alkaligenes nicht gibt.
3. Das Wachstum auf Kartoffel, auf welcher sich der Alkaligenes als gelbbrauner Belag, der Typhusbazillus dagegen unsichtbar entwickelt.

Als 4. für die Begutachtung von Reinkulturen wichtiges Differenzierungsmerkmal stellte ferner Berghaus das absolute Sauerstoffbedürfnis des Alkaligenes fest.

Bei der Nachprüfung dieser Angaben, welche ich zum Zwecke der Identifizierung einiger von mir verhältnismäfsig oft aus Fäzes gezüchteten Alkaligenesstämme vornahm, gelang es mir, einen Unterschied zwischen beiden Bakterien auch in ihrem Verhalten in der Milch festzustellen. Während der Typhusbazillus die Milch dauernd unverändert läfst, beginnt der Fäkalis sie nach Verlauf einer Woche gelb zu färben und mehr oder weniger ausgesprochen aufzuhellen. Diese Erscheinung, welche bei der gewöhnlichen Brutschranktemperatur von 37°C nach 6—8 Tagen aufzutreten pflegte, liefs

sich bei 40° C schon nach 5 Tagen beobachten, während eine weitere Temperaturerhöhung ihren Eintritt sichtlich verzögerte. Besonders deutlich zeigte sich die Aufhellung bei einem mir von Herrn Professor Dr. Petruschky gütigst zur Verfügung gestellten Alkaligenesstamme, während bei den übrigen dieses Phänomen weniger ausgesprochen auftrat, dagegen die Gelbfärbung stets unverkennbar war und demnach als konstantes Charakteristikum angesehen werden mufs. Einige Bedeutung gewinnt dieses Unterscheidungsmerkmal dadurch, dafs der Farbenwechsel und die Aufhellung regelmäfsig auch in Typhus-Alkaligenesgemischen beobachtet und demgemäfs beim Arbeiten mit diesen Bakterienarten als Beweis für die Verunreinigung einer Typhuskultur betrachtet werden können.

So wertvoll diese Eigenschaften für die Identifizierung des Alkaligenes und insbesondere für die Begutachtung von Reinkulturen auch sind, meinem nächsten Ziele brachten sie mich doch nicht näher. Aussichtsvoller schien mir die Verwertung der Tatsache zu sein, dafs der Fäkalis Traubenzucker, den der Typhusbazillus bekanntlich unter Bildung saurer Produkte zersetzt, nicht anzugreifen vermag. Auch Berghaus hat sich diese Erfahrung zunutze gemacht und in der von Christian*) modifizierten Barsiekowschen Nährlösung[11]) deutliche Wachstumsunterschiede erzielt. Meinen Zwecken, welche in erster Linie die Herstellung eines festen Nährsubstrates erforderten, beschlofs ich das Prinzip der bei der Typhusdiagnose so überaus erfolgreich angewandten Endoschen[12]) Züchtungsmethode dienstbar zu machen.

Den Chemismus des Farbenumschlages des Milchzucker-Fuchsinagars beschreibt Endo folgendermafsen: »Fuchsin besteht wesentlich aus salzsaurem Rosanilin $C_{20}H_{19}N_3HCl$. Rosanilin ist eine farblose sog. Leukobase, die mit verschiedenen Säuren, wie Milchsäure, Salzsäure etc., einen roten Farbstoff bildet. Der Säurekomponent des roten Rosanilinsalzes wird durch Reduktionsmittel, wie Natriumsulfit, leicht reduziert. Das dadurch entfärbte

*) Zitiert nach Berghaus.[7])

Rosanilin verbindet sich mit der durch Kolibakterien produzierten Säure und der Nährboden färbt sich schön rot.«

Von dieser Erfahrung ausgehend, konnte nun die Herstellung eines geeigneten Nährsubstrates keine erheblichen Schwierigkeiten bereiten, wenn nur statt des Milchzuckers der für den Typhusbazillus angreifbare Traubenzucker verwandt wurde. Die Agarlösung wurde in der üblichen Weise hergestellt, indem zu 2 l Wasser 80 g Agar, 20 g Liebigs Fleischextrakt, 20 g Pepton Witte und 10 g Kochsalz gefügt, im Autoklaven bis zur Lösung erhitzt und durch Watte filtriert wurden. Zu diesem Gemisch wurden darauf 20 g Traubenzucker, 20 ccm 10proz. Sodalösung, 10 ccm 10proz. alkoholische Fuchsinlösung und 5 g Natriumsulfit (in 50 ccm kochendem Wasser gelöst) hinzugesetzt. Diese Flüssigkeit wurde nun vor dem Gebrauch in grofse Doppelschalen ausgegossen und zeigte nach dem Erstarren den dem Endoschen Nährboden eigentümlichen zarten rosa Farbenton.

Der Unterschied zwischen Typhus- und Alkaligeneskolonien auf diesem Nährsubstrat ist ein eklatanter und gestattet mühelos das Auffinden und Identifizieren der einzelnen Individuen. Während erstere dunkelrote Ansiedelungen mit grünlich schillernder Oberfläche bilden, treten letztere als glasige, klare, im auffallenden Lichte leicht rosa gefärbte Kolonien auf. Der weiteren Verwendung dieses Nährmediums stellten sich jedoch bald neue Schwierigkeiten entgegen, indem die längere Zeit künstlich fortgezüchteten Alkaligenesbazillen im Oberflächenausstrich entweder gar kein oder nur ein höchst kümmerliches Wachstum zeigten, während sich die frisch aus Fäzes isolierten Keime immer kräftig und charakteristisch entwickelt hatten. Dieses Verhalten ging soweit, dafs in Typhus-Alkaligenesgemischen, welche neben 5500 Fäkales nur 50 Eberthsche Stäbchen enthielten, nur letztere sich auf dem Traubenzuckerfuchsinagar nachweisen liefsen. Alle Versuche, diesem Übelstande durch Änderung des Alkaleszenzgrades sowie der Konzentration der einzelnen Zusätze (Agar, Traubenzucker, Natriumsulfit etc.) abzuhelfen, schlugen fehl. Erst als ich ein mit Sublimat getränktes Stückchen Filtrierpapier in den Deckel der Doppelschale gelegt hatte, erhielt ich eine geringe

Verbesserung der Resultate und wurde dadurch zugleich auf die Verwendung eines die Feuchtigkeit mehr zurückhaltenden Nährsubstrates als zweckmäſsig hingewiesen. Ein solches Medium ist uns aber in der Gelatine gegeben, welche bekanntlich beim Erstarren nicht wie Agar Wasser auspreſst.

In der Tat bewiesen die in der Folge mit Gelatine angestellten Versuche, daſs auch die bereits längere Zeit künstlich fortgezüchteten Alkaligenesbazillen im Oberflächenausstrich noch gut zur Entwicklung kamen. Traubenzucker, Fuchsin und Natriumsulfitlösung wurden der gewöhnlichen, schwach alkalischen Nährgelatine in gleichen Mengen wie oben dem Agar zugesetzt; das Material wurde mit einer Platinöse oder Nadel in Form mehrerer Impfstriche auf die Oberfläche der erstarrten Gelatine gebracht. Nach zwei Tagen waren die Alkaligeneskeime als durchsichtige, glasige Kolonien sichtbar, während die Typhusbazillen dunkelrote, im auffallenden Lichte grünlich schillernde Ansiedelungen bildeten. Dabei lieſs sich eine bemerkenswerte Erscheinung beobachten. Sehr oft traten bei einer Reihe der farblosen Alkaligeneskolonien nach 4—5 Tagen dunkelrote Pünktchen auf, welche aus der Mitte der Fäkalisansiedelungen herausgewachsen waren und sich als Typhusbazillen identifizieren lieſsen. Diese häufige Symbiose, welche sich auf der Traubenzucker-Fuchsingelatine mühelos erkennen läſst, mahnt einerseits, wie auch Berghaus betont, zur gröſsten Vorsicht bei der Isolierung unserer Bakterien, würde es aber anderseits als sehr leicht möglich erscheinen lassen, daſs die Ausgangskulturen Altschülers aus einem Gemische von Typhus- und Fäkalisbazillen bestanden.

Schlieſslich verwandte ich den Traubenzucker, die Fuchsin- und Natriumsulfitlösungen in den bereits genannten Mengen auch als Zusatz zu der gewöhnlichen, leicht alkalischen Nährbouillon und erzielte auch hier dieselben Wachstumsunterschiede wie auf Agar und Gelatine. Während der Alkaligenes nur ein oberflächliches Häutchen mit leichter Trübung bildet, die Flüssigkeit im übrigen aber unverändert läſst, ruft

der Typhusbazillus einen tiefdunkelroten Farbenwechsel hervor. Besonders wichtig war diese Tatsache für meine Untersuchungen insofern, als mir die Traubenzucker-Fuchsinbouillon im Verein mit der Lackmusmolke die Möglichkeit in die Hand gab, mich jederzeit über die Lebensfähigkeit der Typhus- und Alkaligenesbazillen in Mischkulturen vergewissern zu können. Dies erschien um so wünschenswerter, als die ausschliefsliche Verwendung der Gelatine erst nach mehrtägiger Beobachtung ein abschliefsendes Urteil erlaubt, während in den flüssigen Nährmedien beide Bakterienarten in der Regel eine gröfsere Wachstumsenergie zeigten. Während nun der Alkaligenes in Lackmusmolke, trotz gleichzeitiger Einsaat einer bedeutend gröfseren Menge von Typhusbazillen, seine Gegenwart durch kräftige Alkalibildung kundzugeben pflegt und dadurch eine Verdrängung der anderen Bakterienart vorzutäuschen vermag, kann ebenso in der Traubenzucker-Fuchsinbouillon schon eine geringe Quantität Eberthscher Stäbchen die charakteristische dunkelrote Verfärbung hervorrufen und dadurch die Anwesenheit der ursprünglich weit zahlreicheren Fäkalisbazillen verdecken. Eine Typhusreinkultur färbt also die Fuchsinbouillon dunkelrot, säuert Lackmusmolke schwach und läfst sie klar; eine Alkaligenesreinkultur bildet in der Fuchsinbouillon nur ein oberflächliches Häutchen, verfärbt sie aber nicht und bläut Lackmusmolke kräftig; ein Typhus-Alkaligenesgemisch schliefslich färbt die Fuchsinbouillon dunkelrot und Lackmusmolke blau.

Das schon oben erwähnte Verhalten in Milch, sowie in der Traubenzucker-Fuchsinbouillon zeigten aufser dem als Testkultur dienenden Petruschkyschen Stamme noch zwei andere aus den Fäzes typhusverdächtiger Personen gezüchtete, sowie ein aus einer frischen Kartoffel isolierter Alkaligenes. Von ersteren erregte meine besondere Aufmerksamkeit ein Stamm (Do.), insofern er auf Agar einen gelblichen Farbstoff produzierte. Da er sich indessen in seinem Wachstum in Milch, welche nach 7 Tagen intensiv gelb gefärbt wurde, ferner in Lackmusmolke, Fuchsin-

bouillon, auf Kartoffeln etc. in nichts von der Testkultur unterschied, zögerte ich nicht, ihn als besondere farbstoffbildende Varietät der Gruppe der Fäkales zuzuzählen. Näher stand dem Alkaligenes Petruschky der aus einer Kartoffel isolierte Stamm (Ka.), der die Gelbfärbung der Milch weniger ausgesprochen, aber immerhin noch deutlich erkennbar hervorzurufen imstande war, während er in den anderen Nährsubstraten durchaus die typische Entwickelung zeigte. Einen anderen aus Fäzes gezüchteten Bazillus dagegen konnte ich trotz seiner Fähigkeit, in Lackmusmolke Alkali zu bilden, nicht unbedingt als Faecalis alcaligenes ansprechen. Zwar zeigte auch er im offenen Schenkel des Smithschen Gährungsröhrchens aerobes Wachstum, doch sank das Oberflächenhäutchen beim Schütteln nicht, wie ich sonst regelmäfsig beobachten konnte, als zusammenhängende Masse zu Boden, sondern löste sich in feine Flöckchen auf. Aufserdem trat die Blaufärbung der Lackmusmolke erst nach 48 Stunden und ohne Häutchenbildung auf, die Gelbfärbung der Milch schliefslich blieb ganz aus. Auf Grund dieser Tatsachen glaubte ich dieses Bakterium nicht als typischen Alkaligenes, vielmehr nur als entfernteren Angehörigen der Fäkalisgruppe betrachten zu müssen.

In Übereinstimmung mit diesen Erfahrungen standen die Ergebnisse der Untersuchungen, welche mir über den Einflufs eines hochwertigen, den Alkaligenes Petruschky in einer Verdünnung 1 : 100000 agglutinierenden Serums auf die anderen Stämme Aufklärung bringen sollten. Es zeigte sich, dafs alle von dem Serum nicht agglutiniert wurden. Auf Grund dieses Verhaltens der einzelnen Alkaligenesstämme zu einem monovalenten Serum, sowie der bereits geschilderten Wachstumsdifferenzen kam ich, ebenso wie Altschüler, Doebert, Berghaus und Trommsdorff, zu dem Resultate, dafs die Bacilli faecales alcaligenes keine einheitliche Bakterienart sind, sondern vielmehr eine Gruppe bilden, ähnlich der grofsen Gruppe der Kolibakterien.

Während sich die bisherigen Untersuchungen mit der Herstellung eines spezifischen, die Isolierung der Typhus- und Alkali-

genesbakterien leicht und sicher ermöglichenden Nährbodens, sowie dem vergleichenden Studium einiger Fäkalisstämme verschiedener Herkunft beschäftigt hatten, sollten die folgenden die Beobachtung beider Bakterienarten in einem gemeinsamen Kulturmedium zum Gegenstande haben. Die Berücksichtigung des absoluten Sauerstoffbedürfnisses des Alkalibildners hätte eigentlich ohne weiteres anaerobe Züchtungsversuche als überflüssig erscheinen lassen können, doch weisen die weiter unten mitgeteilten Ergebnisse auf das Irrige dieser Annahme hin.

Zunächst wurden Typhus- und Alkaligenesbazillen zusammen bei ungehindertem Luftzutritt in Bouillon- und Schrägagarröhrchen, welche lediglich durch sterile Wattebäuschchen vor Verunreinigung geschützt waren, gezüchtet und 4 Monate lang beobachtet. Alle 4 Wochen wurden Proben dieser Mischkulturen auf Traubenzucker-Fuchsingelatine, sowie in Lackmusmolke und Fuchsinbouillon übergeimpft. Aus den Agarkulturen, welche neben den Eberthschen Stäbchen die gleiche, doppelte, fünf- und zehnfache Menge von Alkaligenesbazillen enthielten, liefsen sich beide Bakterienarten noch nach Verlauf von 4 Monaten mit Hilfe der genannten Methoden isolieren. Ein Überwuchern des einen Mikroorganismus hatte also nicht stattgefunden, erscheint indessen bei längerer Beobachtung nicht ausgeschlossen nach dem Befunde von Berghaus, der aus der Doebertschen Original-Alkaligeneskultur nach $^3/_4$ Jahr nur noch den Alkaligenes zu isolieren vermochte.

Die Ergebnisse der Züchtung in gewöhnlicher Nährbouillon veranschaulicht die nachstehende Tabelle:

Mitte XI. 1906	Mitte XII. 1906		Mitte I. 1907		Mitte II. 1907		Mitte III. 1907	
Einsaat in 1 Röhrchen Bouillon	Typhus	Alcaligenes	Typhus	Alcaligenes	Typhus	Alcaligenes	Typhus	Alcaligenes
I. 250 Typhus + 55 Alcaligenes	+	+	+	+	+	+	0	+
II. 500 » + 550 »	+	+	+	+	+	+	0	+
III. 500 » + 275 »	+	+	+	+	0	+	0	+
IV. 500 » + 5500 »	+	+	+	+	+	+	+	+
V. 500 » + 2750 »	+	+	+	+	0	+	0	+
VI. 50 000 » + 5500 »	+	+	+	+	0	+	0	+

Wie aus diesen Ergebnissen hervorgeht, scheint bei der Symbiose von Typhus- und Alkaligenesbazillen der Beschaffenheit des Nährsubstrates eine grofse Bedeutung zuzukommen. Während auf dem festen Agarboden die Typhusbakterien sich noch nach 4 Monaten gegenüber einer gleichzeitig eingesäten zehnfachen Menge der Alkalibildner zu behaupten vermocht hatten und mühelos aus dem Gemisch isolieren liefsen, finden wir ein anderes Verhalten in der flüssigen Nährbouillon. Hier gelang mir schon nach 3 Monaten in der Hälfte der Proben trotz mehrfacher Versuche der Nachweis der Eberthschen Stäbchen nicht mehr. Nach 4 Monaten glückte die Isolierung desselben dann nur noch aus einer einzigen Mischkultur, und auch hier wäre wohl, wie sich mit Rücksicht auf die übrigen Ergebnisse mit gröfster Wahrscheinlichkeit folgern läfst, ein vollkommenes Überwuchern des Fäkalis das Endresultat gewesen. Der Alkaligenes machte also in der Bouillon nach Verlauf von 3—4 Monaten den Nachweis der Typhusbazillen unmöglich, hatte sie demnach überwuchert. Die Menge der eingesäten Mikroorganismen schien bei diesem Prozefs ohne Bedeutung zu sein. Während in der Probe VI, welche die Eberthschen Stäbchen in fast zehnfacher Übermacht enthielt, diese schon nach 3 Monaten verschwunden waren, liefsen sich in der Probe IV, welche umgekehrt die Alkalibildner in über fünffacher Zahl aufwies, beide Bakterienarten noch nach 4 Monaten ohne besondere Schwierigkeit nachweisen.

Die Entscheidung, wie weit an diesem Vorgang einerseits eine in Bouillon vielleicht vermehrte Wachstumsenergie des Alkaligenes und anderseits eine herabgesetzte Entwicklung der Typhusbakterien teil haben, läfst sich kaum treffen. Vermutlich werden beide Faktoren in Betracht zu ziehen sein. Jedenfalls bleibt es eine interessante Tatsache, welche geeignet ist, uns die Züchtungsergebnisse Altschülers zu erklären. Altschüler züchtete Typhusbazillen auf sterilen Plazentastückchen, einem an sich schon stark wasserhaltigen Material, welches überdies durch Hinzufügung physiologischer Kochsalzlösung vor dem Eintrocknen geschützt wurde. Wenn nun seine Ausgangskultur keine Rein-

kultur war, sondern bereits geringste mit den gewöhnlichen Methoden nicht nachweisbare Beimengungen von Alkaligenesbazillen enthielt, so wird es nach meinen Versuchen verständlich, wie sich die Alkalibildner auf dem ihnen besonders zusagenden Nährboden allmählich vermehren und die Typhusbazillen trotz ihrer anfänglichen Überzahl immer mehr zurückdrängen konnten. Ein vollkommenes Überwuchern, wie es ja auch von mir nach 4 Wochen noch nicht beobachtet wurde, war dabei keineswegs notwendig, um eine Reinkultur vorzutäuschen. Wie erwähnt, vermögen bereits geringe Mengen von Fäkalisbazillen trotz gleichzeitiger Anwesenheit einer bedeutend gröfseren Zahl Eberthscher Stäbchen in der Lackmusmolke Alkali zu bilden und sie blau zu färben. Ein ähnliches Gemisch vermag auch auf Kartoffeln den für den Alkaligenes charakteristischen gelbbraunen Belag zu bilden. Auf denselben Vorgang läfst sich vielleicht auch das Ausbleiben der Agglutination zurückführen, indem die Alkalibildner durch ihre Überzahl die Bildung kleinster Häufchen verdecken. Da Altschüler lediglich diese genannten drei Proben zur Prüfung seiner Kulturen verwandte, und durch ungünstige Wachstumsbedingungen abgeschwächte Fäkales erst nach ca. 8 Tagen durch Blaufärbung der Lackmusmolke ihre Gegenwart anzeigen, so konnte ihm einerseits ihre Anwesenheit anfangs leicht entgehen und mufste er anderseits später zu der Ansicht kommen, dafs ihm die Umzüchtung von Typhus- in Alkaligenesbazillen gelungen wäre.

Während die bisherigen Untersuchungen zu dem Ergebnis geführt hatten, dafs der Alkaligenes bei unbehindertem Luftzutritt in einem flüssigen Nährsubstrat den Typhusbazillus nach 3—4 Monaten zu überwuchern imstande ist, ergaben die folgenden, unter anderen Bedingungen angestellten Versuche entgegengesetzte Resultate. Zunächst wurden beide Bakterienarten wiederum auf Agar in der Weise zusammengezüchtet, dafs auf 24stündige Typhus- resp. Alkaligenes-Schrägagarkulturen je eine Öse (2 mg) einer 24stündigen Alkaligenes- resp. Typhusbouillon geimpft wurde. Die Röhrchen wurden darauf zugeschmolzen

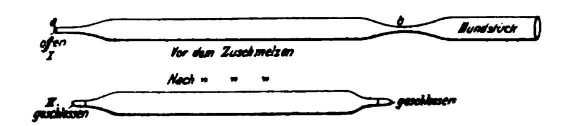
und bei Zimmertemperatur gehalten. Wie eine schon in den nächsten Tagen deutlich sichtbare, inselförmige Erhebung auf den Agarrasen bewies, hatten sich zunächst sowohl die Fäkales, vermöge des in den Röhrchen zurückgebliebenen Sauerstoffrestes, als auch die Eberthschen Stäbchen kräftig entwickelt. Nach $^1/_2$ Jahre wurden dann die Röhrchen geöffnet und auf die oben bereits beschriebene Art mehrfach untersucht. Die Prüfung aller Kulturen ergab jetzt ausnahmslos, dafs die Alkaligenesbazillen vollständig zugrunde gegangen, die Typhuskeime hingegen lebensfähig geblieben waren.

Zur Erklärung dieses Befundes liegt es natürlich am nächsten, auf das absolute Sauerstoffbedürfnis des Alkaligenes hinzuweisen, welches in Verbindung mit dem relativ wasserarmen und darum vielleicht weniger günstigen Nährsubstrate das Absterben des Bazillus infolge des Luftabschlusses zur Folge gehabt haben könnte. Indessen darf nicht vergessen werden, dafs ein immerhin nicht unbedeutender Sauerstoffrest in den Röhrchen geblieben war, so dafs die genannten Momente höchstens eine Abschwächung, nicht aber eine völlige Abtötung begründen würden. Eine solche liefse sich wohl eher auf die in den Gefäfsen angesammelte Kohlensäure zurückführen, welche nach Berghaus' Angabe den Fäkalis binnen kurzer Zeit zu vernichten imstande ist. Da der Typhusbazillus sich auf Agar bekanntlich sehr üppig entwickelt und letzteres wegen seines Reichtums an Kohlehydraten der Säurebildung besonders günstig ist, so dürfte die Menge der entstandenen Kohlensäure, über deren Produktion Weyland[13]) genauere Angaben gemacht hat, nicht unbeträchtlich sein und jedenfalls als genügend betrachtet werden, um die ohnehin abgeschwächten Alkaligenes vollends abzutöten.

Die Züchtung in Bouillon unter Luftabschlufs nahm ich in besonderen Röhrchen (s. Figur) vor, welche ich mir nach Herrn Professor Forsters Angaben zu diesem Zwecke selbst anfertigte.

Die in der Flamme zu Kapillaren ausgezogenen Röhrchen setzen sich an dem einen Ende (*b*), wie aus Fig. I ersichtlich

ist, in ein breiter werdendes Mundstück fort, welches der Sicherheit wegen mit einem Wattebäuschchen verschlossen werden kann. Ebenso wird das offene Kapillarende (*a*) mit Watte umwickelt, so dafs die Röhrchen nun im Trockenraum sterilisiert und nachher bis zum Gebrauch aufbewahrt werden können. Die Füllung geschieht in der Weise, dafs das offene Kapillarende (*a*) in die mit Bakterien geimpfte Nährflüssigkeit getaucht und diese nun vom Mundstück aus bis in die Verbindungskapillare (*b*) hineingesogen wird. Durch Druck des Zeigefingers auf die Saugöffnung wird ein Zurückströmen der Flüssigkeit verhindert. Zum Schlufs wird zuerst das offene Kapillarende (*a*) und darauf die Verbindungskapillare (*b*) in der Flamme zugeschmolzen, wodurch zugleich die Abtrennung des nun entbehrlich gewordenen Mund-



stückes erfolgt. Erfolgt die Füllung und Schliefsung des Röhrchens in sorgfältiger Weise, so erhält man einen völlig genügenden Luftabschlufs, abgesehen von den in der Nährflüssigkeit selbst und etwaigen an den Enden des Röhrchens zurückgebliebenen minimalen Sauerstoffresten. Indes haben sich letztere mir nicht störend bemerkbar gemacht; wenigstens zeigte der Tetanusbazillus, der Typus eines obligaten Anaerobiers, in diesen Röhrchen kräftiges Wachstum. Die Öffnung erfolgt in der Weise, dafs man unter Beobachtung aseptischer Kautelen an beiden Enden mit einer scharfen Feile Einkerbungen macht, worauf sich die Spitzen leicht entfernen lassen. Eine weitere Benutzung ist nach einmaliger Öffnung natürlich nicht mehr möglich.

Typhus- und Alkaligenesbazillen zeigen bei Züchtung in diesen Röhrchen ein durchaus verschiedenes Verhalten. Während erstere schon nach 24 Stunden eine kräftige Trübung der Bouillon bewirken, lassen letztere sie vollkommen klar. Die Vernichtung der eingeschlossenen Fäkales erfolgt zunächst rapide. Von ungefähr 5000000 Keimen liefsen sich nach 12 Tagen nur noch 10—50

nachweisen. Eine weitere Abnahme erfolgte indessen nicht, vielmehr liefs sich noch nach 4 Wochen und selbst nach fast 5 Monaten die gleiche Anzahl Keime feststellen. Es hatte also der Alkaligenes, wie es bereits Willimsky[14]) für die aeroben Bakterien zu zeigen vermochte, seine Lebensfunktionen auf die in dem Nährsubstrat enthaltenen minimalen Spuren von Sauerstoff eingestellt und gewissermafsen ein latentes Dasein geführt, um sich dann beim Eintritt günstiger Wachstumsbedingungen weiter zu entwickeln. Wir haben es bei diesem Vorgange mit der bekannten, durch mehrere aus dem hiesigen Institute hervorgegangene Arbeiten bewiesenen Erfahrung zu tun, dafs sich in jeder Kultur besonders widerstandsfähige Individuen finden, welche dazu berufen sind, die Forterhaltung der Art unter abnormen Lebensverhältnissen zu sichern. So konnte Brehme[15]) nachweisen, dafs in Typhus- und Cholerabouillonkulturen die einzelnen Keime der Einwirkung der Kälte verschieden lange widerstehen. Ein ähnliches Verhalten stellten E. Levy und Bruns[16]) im Anschlufs an Beobachtungen von Professor Forster für die Tetanussporen gegenüber der Erhitzung auf 100° fest. Zu gleichen Ergebnissen gelangte Schmidt[17]) bei seinen umfangreichen, unter Leitung von Professor Forster ausgeführten Untersuchungen über die Widerstandsfähigkeit der Rauschbrandsporen gegenüber Hitze. Schliefslich konnte Fornet[18]) ein verschiedenes Resistenzvermögen für die einzelnen Organismen einer Typhusbouillonkultur gegenüber der bakteriziden Wirkung der Galle dartun. Die von mir gemachte Beobachtung über das Verhalten des Alkaligenes gegenüber Luftabschlufs würde demnach als weitere Bestätigung dieser Erfahrungen zu gelten haben.

Die Ergebnisse der Einzelzüchtungsversuche in den Anaerobenröhrchen berechtigten natürlich einen Schlufs auf das Verhalten beider Bakterienarten in der Symbiose nicht. Indessen zeigten die in dieser Richtung angestellten Versuche, dafs der Alkaligenes vom Typhusbazillus auch nach längerer Zeit nicht überwuchert wird. Die Anaerobenröhrchen wurden mit ca. 5000000 Fäkales und ebensoviel Eberthschen Stäbchen beschickt und bei Zimmertemperatur gehalten.

Noch nach 4 Monaten liefsen sich neben den Typhuserregern Alkalibildner ohne Schwierigkeit nachweisen. Auch hier wieder ist die Bedeutung, welche die Zusammensetzung des Nährsubstrates für die Lebensfähigkeit der Bakterien hat, unverkennbar. Während in den zugeschmolzenen Agarröhrchen ein vollständiges Absterben der Alkaligenes erfolgte, lassen sich aus den bei weitem weniger Luft enthaltenden Bouillonröhrchen noch lebensfähige Keime züchten. Dafs zwar auch hier eine Abschwächung der übrig gebliebenen Individuen erfolgte, ist wohl zweifellos. Dafür spricht vor allem die von mir mehrfach beobachtete Tatsache, dafs bei einzelnen Proben die Alkalibildung in Lackmusmolke nicht sofort eintrat, wie es sonst die Regel ist, sondern erst nach 8 Tagen deutlich sichtbar wurde. Indessen fallen die bei den Agarkulturen aufserdem hinzukommenden schädigenden Einflüsse hier kaum oder nicht wesentlich ins Gewicht, indem der Typhusbazillus sich in Bouillon weniger üppig als auf Agar entwickelt und in ihr bei weitem nicht so günstige Bedingungen für die Kohlensäurebildung vorfindet als auf dem kohlehydratreichen, festen Nährsubstrat. Diese Erwägungen würden es erklären, dafs es in den Bouillon-Anaerobenröhrchen bei der Symbiose von Typhus- und Alkaligenesbazillen zwar zu einer Abschwächung der letzteren, aber nicht zu einer völligen Abtötung kommt.

Die Anwendung dieser Erfahrungen zur Erklärung der Altschülerschen Beobachtungen ist nicht ohne weiteres statthaft, da die Versuche unter Luftabschlufs, also unter aufsergewöhnlichen Bedingungen ausgeführt wurden, was bei den Untersuchungen Altschülers nicht der Fall war. Immerhin dürfte auch hier eine Verwertung meiner Ergebnisse sich ermöglichen lassen. Meine Untersuchungen zeigten, dafs es bei der Symbiose von Typhus- und Alkaligenesbazillen unter bestimmten Umständen einerseits zu einer völligen Abtötung, anderseits aber auch zu einer deutlichen Abschwächung kommen kann. Es wäre nun sehr wohl denkbar, dafs es noch eine ganze Reihe anderer uns vorläufig unbekannter Einflüsse, chemischer oder physikalischer Natur, geben könnte, welche in ähnlicher Weise eine Verminderung der Lebenskraft des Alkaligenes hervorzurufen imstande

wären. Auf diese Weise liefse es sich erklären, wie die von Altschüler benutzte, mit wenig Typhusindividuen gemischte Alkaligenesausgangskultur durch unkontrollierbare schädigende Einflüsse abgeschwächt worden wäre und nun den Eberthschen Stäbchen freien Spielraum zur Entwicklung geboten hätte. Die regelmäfsig vorgenommenen Prüfungen mufsten sodann schliefslich zur irrigen Annahme führen, dafs eine Umwandlung der Alkaligenes in Typhusbazillen stattgefunden habe.

Die vorliegenden Untersuchungen ermöglichen es meines Erachtens, die mit Hilfe der gebräuchlichen Methoden gemachten, an und für sich richtigen, aber irrig gedeuteten Beobachtungen Altschülers zwanglos zu erklären. Ich konnte zeigen, dafs unter bestimmten, oben näher genannten Bedingungen in einem Typhus-Alkaligenesgemisch die eine oder die andere Bakterienart völlig verschwindet und dadurch die übrig bleibende als Reinkultur erhalten wird.

Strafsburg i. Els., April 1907.

Literaturverzeichnis.

1. Altschüler, Über die Beziehungen des Bacillus faecalis alcaligenes zu den Typhusbazillen. Münch. med. Wochenschr. 1904, Nr. 20.
2. Doebert, Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen dem Bacillus faecalis alcaligenes und dem Typhusbazillus. Archiv f. Hygiene, 1905, Bd. 52.
3. Conradi, Typhusbazillus und Bacillus faecalis alcaligenes. Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 38.
4. Boit, Einfache und sichere Identifizierung des Typhusbazillus. Jena, 1905. Verlag von Gustav Fischer.
5. Berghaus, Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen dem Bac. faecalis alcaligenes und dem Typhusbazillus. Hyg. Rundschau, 1905, Bd. 15, Nr. 15.
6. Trommsdorff, Typhusbazillus und Bacillus faecalis alcaligenes, zwei nicht verwandte Spezies. Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 35.
7. Berghaus, Der Bacillus faecalis alcaligenes. Hyg. Rundschau, 1905, Bd. 15, Nr. 23.
8. Gaehtgens, Über die Bedeutung des Vorkommens der Paratyphusbazillen. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, 1907, Bd. 25.
9. Petruschky, Bakterio-chemische Untersuchungen. Zentralbl. f. Bakteriologie, 1889, Bd. 6.
10. —, Bacillus faecalis alcaligenes. Ebenda, 1896, Bd. 19.
11. Barsiekow, Beiträge zur Differentialdiagnose des Typhusbazillus. Wiener klin. Rundschau 1901, Nr. 41.
12. Endo, Über ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbazillen. Zentralblatt f. Bakt., 1903, Bd. 35.
13. Weyland, Zur Differenzierung der Typhusbazillen von typhusähnlichen Bakterien. Archiv f. Hygiene, 1892, Bd. 14.
14. Willimsky, Über das Verhalten der aeroben Keime gegenüber der absoluten Sauerstoffentziehung. Archiv f. Hyg., 1905, Bd. 54.
15. Brehme, Über die Widerstandsfähigkeit der Choleravibrionen und Typhusbazillen gegenüber niederen Temperaturen. Archiv f. Hyg., Bd. 40.
16. E. Levy und Bruns, Über den Gehalt käuflicher Gelatine an Tetanuskeimen. Deutsche med. Wochenschr., 1902, Nr. 28.
17. Albert Schmidt, Über das Verhalten der Rauschbrandbazillensporen bei der Erhitzung. Inaug.-Dissertation. Strafsburg 1906.
18. Fornet, Über die Bakterizidie der Galle. Arch. f. Hyg., 1907, Bd. 60.

Nachtrag bei der Korrektur.

Nach Abschlufs meiner Untersuchungen erschien im Zentralblatt für Bakteriologie 1907, Bd. 43, S. 755—774, eine Arbeit »Die Gruppe des Bacillus faecalis alcaligenes« von Klimenko, durch welche einzelne meiner Angaben bestätigt werden. Auch K. konnte die Aufhellung und gelbe Verfärbung der Milch durch den Alcaligenes feststellen. Als eine dem Faecalis zwar nahestehende, aber immerhin selbständige Gruppe will er die des Bac. fluorescens non liquefaciens anerkannt wissen, hiervon aber den ein gelbes Pigment bildenden Stamm Petruschky III (vielleicht dem von mir aus einer Kartoffel gezüchteten Stamme Ka. entsprechend) als besondere Untergruppe ausschliefsen.

Über die Wirkung der Kohlensäure, des Sauerstoffs und des Wasserstoffs auf Bakterien bei verschiedenen Druckhöhen.

Von

Stabsarzt Dr. **Berghaus**,
früheren Assistenten am Institut.

(Aus dem Kgl. Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Rubner.)

I. Wirkung der Kohlensäure.

Vor ungefähr vier Jahren wurden auf Veranlassung des Herrn Geh. Rat Rubner von W. Hoffmann[1]) im hiesigen Institut eingehende Versuche »über den Einfluſs hohen Kohlensäuredrucks auf Bakterien im Wasser und in der Milch« ausgeführt. Es ergab sich, daſs eine stationäre Einwirkung der Kohlensäure unter einem Druck von 5, 10 und 20 Atm. während 25 Stunden im Spreewasser vorhandene Keime derartig beeinfluſste, daſs Gelatineplatten mit 1,0 bis 2,0 ccm des Wassers gegossen bei mehrtägiger Beobachtung keine bzw. nur ganz vereinzelte Kolonien auswachsen lieſsen. So konnten z. B. bei einer anfänglichen Keimzahl von 8262 bzw. 20450 pro ccm nach einer 24 stündigen Einwirkung von 5 bzw. 10 Atm. CO_2 keine, bei einem Druck von 20 Atm. von 7318 nur noch fünf lebensfähige Keime nachgewiesen werden. Allerdings erwiesen sich die angeführten Druckhöhen in ihrer Wirkung nicht so radikal bakterientötend, wenn dem unter dem Einfluſs der CO_2 ge-

wesenen Wasser nachträglich flüssige Nährstoffe (Peptonlösung) zugesetzt wurde und somit optimale Lebensbedingungen geboten waren, so dafs auch abgeschwächte Keime wieder lebens- und vermehrungsfähig werden konnten, eine Eigenschaft, die die Nährgelatine bekanntermafsen vermissen läfst. Bei dieser neuen Versuchsanordnung zeigte sich ein 20 atmosphäriger CO_2-Druck mit 20stündiger Einwirkungsdauer niemals als ausreichend für die Sterilisierung des Wassers; wurde aber der CO_2-Druck auf ca. 50 Atm. erhöht, so blieb nach einer 22stündigen Einwirkung bei einer Temperatur zwischen 10 und 37° jedes Wachstum von Wasserbakterien auf festen Nährböden aus. Eine Verkürzung der Einwirkungsdauer verminderte den Effekt, bei nur sechsstündigem Druck von 50 Atm. war das Wasser nicht keimfrei. Weniger günstig waren die Resultate bei Verwendung von Kanalwasser. In diesem konnte zwar unter obigen Versuchsbedingungen eine bedeutende Verringerung der Keime von 2040010 auf 330, niemals aber Keimfreiheit erzielt werden.

Handelte es sich bei diesen Versuchen um Gemische verschiedener Bakterien, in überwiegender Mehrzahl saprophytischer Arten, so erwiesen sich wässrige Aufschwemmungen von pathogenen Bakterien, den Typhus-, Cholera- und Ruhrbazillen erheblich empfindlicher der CO_2 gegenüber. Typhusbazillen und Choleravibronen waren nach zweistündiger, Koli- und Ruhrbazillen nach dreistündiger Einwirkung einer 50atmosphärischen CO_2 nicht mehr entwicklungsfähig, trotzdem die üblichen Anreicherungsmethoden zur Anwendung gelangten.

Ohne merklichen Einflufs war die CO_2, wenn zu den Versuchen in Bouillon suspendierte Bakterien verwendet wurden, und zwar auch dann, wenn die Bouillonkulturen mit sterilem Leitungswasser verdünnt wurden. Es zeigte sich hier eine Erhöhung der Widerstandskraft der kleinen Lebewesen in eiweifshaltigen Flüssigkeiten, wie sie bereits seit langem bekannt ist, und bei jeder Resistenzprüfung der Bakterien gegenüber den Desinfektionsmitteln überhaupt in mehr oder minder hohem Mafse in die Erscheinung tritt. Ähnlich wie in der Bouillonkultur verhielten sich auch die Bakterien in der Milch. Durch

einen CO_2-Druck von 50 Atm. konnten sie nicht abgetötet werden; zwar war eine sehr starke Reduktion der Keimzahl zu konstatieren, ein Teil jedoch blieb stets lebenskräftig und wuchs auf den Gelatineplatten zu Kolonien aus.

Die günstigen Resultate, die bei der Einwirkung der CO_2 auf die im Wasser aufgeschwemmten Erreger des Typhus, der Cholera und der Ruhr erzielt wurden, gaben Veranlassung, diese Sterilisierungsmethode für praktische Zwecke in Erwägung zu ziehen. Ihrer Verwendung stellten sich aber schon von vornherein unüberwindliche Schwierigkeiten rein technischer Art entgegen, auf die ich hier nicht näher eingehen will.

An diese kurz skizzierten Versuche schliefsen sich die von mir angestellten an, sie bilden gewissermafsen ihre Fortsetzung. Handelte es sich bei den Versuchen Hoffmanns vornehmlich darum, für praktische Zwecke die flüssige Kohlensäure verwertbar zu machen, so ging mein Bestreben dahin, systematisch den Einflufs der Kohlensäure in abgestuften Konzentrationen auf eine gröfsere Anzahl von Bakterien zu prüfen.

Die Angaben in der Literatur über die Einwirkung der CO_2 auf die Bakterien unter einem erhöhten Druck sind bereits ausführlich in der Arbeit Hoffmanns zusammengestellt, so dafs es sich erübrigt, hier des Näheren auf sie einzugehen. Sie sind verhältnismäfsig spärlich und zum grofsen Teil auch widersprechend. Der Grund hierfür ist einerseits darin zu suchen, dafs derartige Versuche sich nur mit besonderen, kostspieligen Apparaten ausführen lassen, anderseits aber das Medium, in dem die Bakterien der CO_2 ausgesetzt wurden, bei den verschiedenen Untersuchungen nicht dieselbe Zusammensetzung aufwies. Welch weittragende Bedeutung aber gerade dieser Umstand hat, zeigen die oben besprochenen Versuche Hoffmanns mit Bouillonkulturen. Die Versuche d'Arsonvals[2]), der durch etwa 50 atmosphärische CO_2 eine Entwicklung der Bakterien in einer Flüssigkeit hemmen, ja diese sterilisieren konnte, konnten bei einer Nachprüfung Sabrazès und Bazin[3]) für Staphylococcus pyogenes aureus, Bacterium coli, Typhusbazillus und Milzbrand-

bazillus nicht bestätigen, sie bedienten sich aber zu ihren Versuchen Bouillonkulturen. Zu einem ähnlichen Resultat kamen Schaffer und Freudenreich[4]) gleichfalls für den Typhus- und Milzbrandbazillus. Die Bakterien zeigten sich weder in ihren sonstigen Lebensäufserungen, noch in ihrer Virulenz irgendwie beeinträchtigt, obgleich in den Versuchen der beiden letzten Autoren 7 Tage lang ein Druck von 47 Atm. CO_2 angewandt wurde. Auch durch gleichzeitige Temperatursteigerung konnte, wenn nicht schon an und für sich eine Abtötung durch diese bedingt war, die Wirkung der CO_2 nicht verstärkt werden. Weitere Versuche von d'Arsonval und Charrin[5]), die mit Pyocyaneuskulturen angestellt wurden, liefsen aber unzweideutig die Beeinflussung durch eine 50atmosphärische CO_2 erkennen. Nach zwei Stunden zeigte sich die Vermehrungsintensität, nach vier Stunden Einwirkung die Farbstoffbildung beschränkt, nach sechs Stunden wurde nur selten noch Wachstum beobachtet und nach 24 Stunden waren die Keime stets abgestorben. Milzbrandbazillen wurden bei einem gleichen CO_2-Druck nach 12 Stunden vernichtet.

Für die Praxis von Wichtigkeit sind die Beobachtungen, die über den Bakteriengehalt künstlicher kohlensaurer Wasser gemacht wurden. Künstliches Selterwasser ist gewöhnlich sehr keimreich (Sohnke([6]), Pfuhl([7]), Hochstetter([8])) und enthält oft 10000 und mehr Bakterien in 1 ccm. Befindet sich das Wasser unter einem hohen CO_2-Druck, so kommt es zwar häufig nach den Untersuchungen Leonés([9]), Sohnkes([6]), Scolas und Alessis([10]) zu einer Abnahme der Keime, sie ist jedoch abhängig von der Art der vorhandenen Bakterien. Durch den Genufs verunreinigten Selterwassers sind nachweislich Typhusepidemien entstanden (Hellwig([11]). Hochstetter fand sporenfreie Milzbrandbazillen schon nach einer Stunde, Choleravibrionen nach drei Stunden (und ganz ausnahmslos nach 24 Stunden), Typhusbazillen nach längstens fünf Tagen abgestorben; Milzbrandsporen waren noch nach fünf Monaten lebensfähig. Dräer([12]) konnte Choleravibrionen im Selterwasser hin und wieder noch nach 24 Stunden, nie nach zwei Tagen nachweisen.

Weit eingehender und systematisch behandelt sind die Untersuchungen über die Einwirkung der CO_2 bei normalem atmosphärischem Druck, wie ja auch wohl die bei diesen Versuchen gefundenen Resultate den Anstofs gegeben haben dürften zu den Untersuchungen bei erhöhtem Druck.

Wir sehen hier eine gröfsere Anzahl Bakterien in Reinkultur dem CO_2-Strom ausgesetzt, während in den oben angeführten Versuchen es sich vielfach um Gemische verschiedenartiger Bakterien handelt, die einwandfreie Beurteilungen nicht zulassen. Zum Zweck der Gegenüberstellung mit meinen Untersuchungsergebnissen seien hier die wichtigsten und einwandfreien Resultate kurz in tabellarischer Übersicht wiedergegeben. Die Untersuchungen fanden ihren Abschlufs in einer umfangreichen Versuchsreihe, die C. Fränkel(13) in einer Arbeit »Die Einwirkung der Kohlensäure auf die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen« niederlegte.

Zusammenstellung 1.

Einwirkung der CO_2 auf Bakterien ohne Druckerhöhung.

Autor	Bakterienart	Medium, in dem die Prüfung stattgefunden	Einwirkungsdauer	Wirkung
1. Pasteur und Joubert (14)	Milzbrandbazillen	—	—	abgestorben
2. Szpilmann (15)	dto.	Blut	24 Std.	»
3. Buchner (16)	a) Cholera-Vibrio	Fleischwasser	8 Tage	keine Vermehrg.
	b) Emmerichsch. B.	»	2 Tage	schwch. Wachst.
	c) Typhusbazillus	»		do.
4. Liborius (17)	a) Baz. des malignen Ödems	Nährgelatine	—	kein Wachstum
	b) Bac. polypifermis		—	do.
5. Schottelius (18)	Mikrococcus prodig.	Kartoffel	—	Verlust d. Farbstoffbildung
6. Frankland (19)	a) Bac. pyocyaneus	Gelatineplatt.	5 u. 9 Tg.	abgestorben
	b) Cholera Vibrio		4 u. 5 Tg.	»
	c) Vibrio Finkler		4 Tage	»
7. Sirotinin (20)	a) Bac. typhi abd.	Gelatine-röhrchen	—	langsamer u. wenig. starkes Wachstum
	b) Spir. Chol. asiat	do.	—	do.
	c) Spir. Finkler	do.	—	do.
	d) Staphylococc. alb.	do.	—	do.
	e) Bac. fluorescens liquef.	do.	—	starke Hemmung
	f) Bac. anthracis	do.	—	in CO_2-Atmos. kein Wachst., nachträgl. Entwickl. i. gew. Luft
	g) Bac. cunicularis	do.	—	do.
	h) Bac. muriseptic.	do.	—	do.

Fränkel, dessen Resultate in der folgenden Übersicht wiedergegeben werden, ging bei seinen Untersuchungen in der Weise vor, dafs er Reinkulturen von Bakterien in Gelatine bzw. Bouillon aussäte, erstere in der von Esmarch angegebenen Weise an den Wandungen ausrollte und durch diese Kulturröhrchen dann in den einem Kippschen Apparate aus Marmor und roher Salzsäure erzeugten CO_2-Strom leitete. Die Gelatine wurde vor ihrer Besäung in noch flüssigem Zustande durch einen CO_2-Strom von der in ihr befindlichen Luft befreit. Wenn die CO_2 eine bestimmte Reihe von Tagen, meist etwa 1—2 Wochen lang ununterbrochen den Nährboden um- bzw. durchspült hatte, wurde aus einem Gasometer gewöhnliche Luft durch die Gefäfse geleitet, um den bis dahin, d. h. während der CO_2-Einwirkung nicht zur Entwicklung gekommenen Keimen noch nachträglich günstige Lebensbedingungen zu verschaffen und die Auskeimung zu ermöglichen.

Zusammenstellung 2.

Einwirkung der CO_2 auf Bakterien nach C. Fränkel.

Lfd. Nr.	Bakterienart	Wirkung der CO_2
1.	Micrococcus prodigios.	entwicklungshemmend, Wachstum in CO_2-Atmosphäre ohne Farbstoffbildung.
2.	Bacillus indicus . . .	desgl.
3.	Gelbe Sarcine . . .	hervorragend entwicklungshemmend, kein Wachstum in CO_2-Atmosphäre.
4.	Orange Sarcine . . .	desgl.
5.	Heubazillus	desgl.
6.	Wurzelbazillus . . .	desgl.
7.	Bac. megatherium . .	desgl.
8.	Roter Baz. aus Wasser	desgl. und Verminderung der Keimzahl.
9.	Violetter Bazillus . .	desgl. desgl.
10.	Fluoreszierender Baz. .	desgl. desgl.
11.	Phosphoreszier. Bazill. (nicht verflüssigend)	nicht sonderlich hemmend, Verlust der Phosphoreszenz
12.	Proteus vulgaris . . .	Verlangsamung des Wachstums, Entwicklung auch in CO_2-Atmosphäre.
13.	Bact. Zopfii	desgl.

Fortsetzung der Zusammenstellung 2.
Einwirkung der CO_2 auf Bakterien nach C. Fränkel.

Lfd. Nr.	Bakterienart	Wirkung der CO_2
14.	Bazill. der blauen Milch	kein Wachstum in CO_2-Atmosphäre, nachträgliche Entwicklung in gewöhnlicher Luft.
15.	Bac. acid. lact. (Hüppe)	kein Einflufs.
16.	Bac. butyricus (Hüppe)	kein Wachstum in CO_2-Atmosphäre, nachträgliche Entwicklung in gewöhnlicher Luft.
17.	Rosa Hefe	desgl.
18.	Schwarze Hefe . . .	desgl.
19.	Weifsbierhefe . . .	Wachstum vortrefflich in CO_2-Atmosphäre.
20.	Milzbrandbazillus . .	während der CO_2-Einwirkung kein Wachstum, Abtötung eines Teils der Keime.
21.	Choleravibrio	desgl.
22.	Finklers Bazillus . .	desgl.
23.	Denekes Bazillus . .	desgl.
24.	Friedländers Pneumobacterium	kein Einflufs.
25.	Micrococcus tetragenus	beschränktes Wachstum in CO_2-Atmosphäre, bei Bruttemperatur besseres Wachstum.
26.	Baz. des Typh. abdom.	kaum ein Einflufs.
27.	Emmerichs Bazillus .	desgl.
28.	Briegers Bazillus . .	desgl.
29.	Staphylococc. pyog. aur.	entwicklungshemmend, nur b. Bruttemperatur beschränktes Wachstum.
30.	Staphylococc. pyog. alb.	desgl.
31.	Streptococcus pyogenes	desgl.
32.	Streptococc. erysipelat.	desgl.
33.	Bac. pyocyaneus . .	entwicklungshemmend, in CO_2-Atmosphäre kein Wachstum.
34.	Baz. d. Hühnercholera	desgl.
35.	Baz. d. Kaninchensepticämie	desgl.
36.	Baz. d. Schweineseuche	desgl.
37.	Baz. d. Mäusesepticäm.	entschieden entwicklungshemmend, teilweise abtötend.
38.	Baz. d. Schweinerotlauf.	desgl.
39.	Rauschbrandbazillus .	entwicklungshemmend, kein Wachstum in CO_2-Atmosphäre.
40.	Bac. d. malignen Ödems	desgl.

Beide Zusammenstellungen zeigen unzweideutig, dafs auch bei atmosphärischem Druck die Kohlensäure für die Bakterien kein indifferentes Gas ist. Bei den Bakterienarten der ersten Tabelle tritt überall die entwicklungshemmende Eigenschaft deut-

lich zutage, die bei einzelnen sich direkt bis zur Abtötung steigert. Dafs bei den Autoren bezüglich ein und derselben Bakterienart vielfach das Urteil anders lautet, darf nicht wundernehmen, wenn man in Betracht zieht, dafs schon geringe Differenzen in der Zusammensetzung der Medien, in denen die Bakterien während des Versuchs sich befanden, die Resistenz beeinflussen können. Aber ein weiteres fällt in der Zusammenstellung sofort auf, das ist die verschiedene Widerstandsfähigkeit verschiedener Bakterienarten bei demselben Untersucher unter Anwendung derselben Versuchsbedingungen, eine Beobachtung, die in eklatanter Weise durch die eingehenden Untersuchungen Fränkels bestätigt wurde. Wenn auch in diesen genaue quantitative Abmessungen über die CO_2-Wirkung nicht gegeben werden, dazu wäre eine Bestimmung der Keimzahl notwendig gewesen, so gibt die grofse Zahl der geprüften Keimarten immerhin schon ein klares Bild über den graduellen Einflufs des Gases. Eine Anzahl von Mikroorganismen vermag im Kohlensäurestrom zu fast ebenso schneller und ausgiebiger Entwicklung zu kommen, wie in der gewöhnlichen Atmosphäre, so der Bacillus Typhi abdominalis, der Emmerichsche und der Briegersche Bacillus, das Friedländersche Pneumobakterium, der Hueppesche Bazillus der Milchsäuregährung, ferner auch die echte Bierhefe.

Viele andere keimen in reiner CO_2-Luft wohl aus, aber ihr Wachstum ist sowohl quantitativ beschränkt, als auch erleidet es der Zeit nach erhebliche Verzögerung, wie Kontrollkulturen erwiesen. Hierher gehören der M. prodigiosus, der Bac. indicus, der Proteus vulgaris, der Bac. phosphorescenz.

Eine dritte Gruppe ist dadurch charakterisiert, dafs sie imstande ist, dem Einflufs der CO_2 nur bei Unterstützung durch optimale Temperaturverhältnisse zu paralysieren. Zu diesen gehört der M. tetragenus, die Bakterien der Hühnercholera, Schweineseuche, Kaninchenseptikaemie, des Schweinerotlaufs und der Mauseseptikaemie, der Streptococcus pyogenes und der des Erysipels, der Staphylococcus aureus und albus.

Die letzte Gruppe umfafst die gröfste Anzahl der Bakterien, sowohl saprophytische als pathogene Arten, unter diesen den

Milzbrandbazillus und Choleravibrio. Die CO_2 erweist sich hier als ein unbedingt entwicklungshemmendes Agens, indem während ihrer Einwirkung es niemals zu einer Vermehrung, d. h. einem Auswachsen zu Kolonien kam. Diese entwicklungshemmende Eigenschaft steigerte sich bei einigen Keimarten in eine abtötende. Bouillonkulturen, z. B. von Milzbrandbazillen und Choleravibrionen, zeigten Keimverminderung um das Hundert- bis Tausendfache, wenn sie einige Tage (5) dem CO_2-Strom ausgesetzt gewesen waren. Der Bazillus Deneke war sogar nach drei Tagen abgetötet. In charakteristischer Weise tritt die bakterienschädliche Wirkung der CO_2 zutage bei den Versuchen Fränkels, anstatt in einer wasserstoff- in einer kohlensäurehaltigen Atmosphäre anaerobe Bakterien zu züchten: das Wachstum blieb aus.

Bei meinen Versuchen wurden folgende Bakterienarten der Einwirkung der CO_2 ausgesetzt:

1. 1 Cholera-Stamm,
2. 1 Milzbrand-Stamm,
3. 3 Typhus-Stämme,
4. 4 Koli-Stämme,
5. 3 Bac. faecalis alcaligenes-Stämme,
6. 1 Enteritis-Gärtner-Stamm,
7. 1 Dysenterie Shiga-Kruse-Stamm,
8. 1 Dysenterie Flexner-Stamm,
9. 1 Paratyphus A-Stamm,
10. 1 Paratyphus B-Stamm,
11. 1 Staphylococcus pyogenes aureus-Stamm,
12. 1 Bacillus pyocyaneus-Stamm,
13. 1 Proteus vulgaris-Stamm.

Zur Untersuchung gelangten möglichst lebenskräftige Keime, und zwar wurden sie ausnahmslos 20—24stündigen Bouillonkulturen entnommen. Von diesen wurden ein bis zwei Ösen auf der Oberfläche frisch gegossener Agarplatten ausgestrichen. Die so beschickten Schalen blieben in den weiter unten näher zu beschreibenden Behältern bei verschiedenem Druck je 24 Stunden

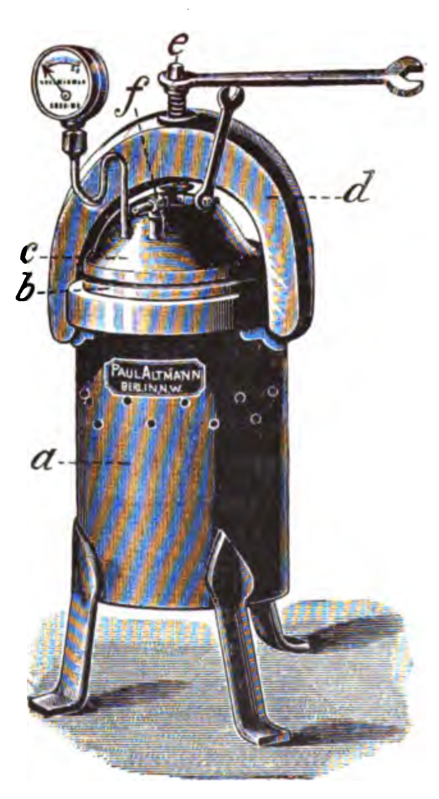
offen in der CO_2-Atmosphäre bei Bruttemperatur stehen, um dann ebenfalls im Brutschrank in der gewöhnlichen atmosphärischen Luft weiter beobachtet zu werden, falls sich nicht schon unter der CO_2-Einwirkung kräftiges Wachstum gezeigt hatte. Das Gas wurde Bomben entnommen, wie sie im Handel käuflich zu haben sind und heutzutage fast in jeder Bierwirtschaft verwendet werden.

Wie sich aus dieser Versuchsanordnung ohne weiteres ergibt, war der Grundgedanke meiner Versuche festzustellen, in welcher Konzentration die CO_2 einen entwicklungshemmenden bzw. abtötenden Einflufs auf die Bakterien auszuüben imstande sei. Der Umstand, dafs in ein und derselben Kultur Keime verschiedener Resistenz sind, blieb unberücksichtigt; für die Beurteilung der CO_2-Wirkung war ausschliefslich mafsgebend, ob Wachstum eintrat oder nicht, somit stellen meine Versuche Desinfektionsversuche optima forma dar, allerdings insofern abweichend von den üblichen Methoden, als bei gleichbleibender Einwirkungsdauer die Konzentration des Mediums geändert wurde.

Das Verhalten der aufgeführten Bakterienarten gegenüber der CO_2 bei gewöhnlichem atmosphärischem Druck prüfte ich in dem bekannten, von Bischoff(2) modifizierten Apparat zur Züchtung anaerober Bakterien. Nachdem längere Zeit (ca. $^1/_2$ Stunde) ein kräftiger Gasstrom durch den Apparat geleitet worden war, um möglichst jede Spur atmosphärischer Luft auszuwaschen, wurden etwaige Reste von Sauerstoff noch durch alkalische Pyrogallollösung beseitigt. Bei der Anwendung erhöhter Drucke bediente ich mich des Autoklaven, den auch Hoffmann zum Teil bei seinen Versuchen verwendet hatte, und der von ihm bereits in seiner Abhandlung näher beschrieben wurde, so dafs ich mich, indem ich gleichzeitig eine Abbildung gebe, auf wenige Erklärungen beschränken kann.

Der in dem Gestell *a* ruhende Kessel *b* wird durch einen aufgeschliffenen Deckel *c* nach oben hin abgeschlossen und dieser durch einen kräftigen Stahlbügel *d* mit einer Zentralschraube *e* fest gegen den Kesselrand geprefst, so dafs auch bei hohem Druck im Innern der Abschlufs völlig gasdicht ist. In dem helm-

förmigen Deckel befindet sich ein Manometer, ferner eine durch Stellschrauben verschliefsbare Einlafs- und dieser entgegengesetzt eine Auslafsöffnung für die zur Verwendung kommenden Gasarten. Der Apparat besteht aus geschmiedetem Kupfer und war auf 75 Atm. geeicht. Die lichte Weite des Kessels beträgt 7 cm; ein Gestell von entsprechender Gröfse diente zur Aufnahme der Agarplatten. Während bei der Versuchsanordnung im anaeroben Apparat gewöhnliche Petrischalen mit den Keimen beschickt wurden, konnten jetzt nur ca. 4 cm im Durchmesser haltende Schälchen verwendet werden. Sobald der gefüllte Apparat geschlossen war, wurde bei geöffnetem Auslafs das Gas unter mehratmosphärigem Druck in den Kessel gelassen und so die darin befindliche Luft beseitigt. Alsdann wurde der Auslafs geschlossen und nun unter Beobachtung des Manometers der gewünschte Druck hergestellt. War dieser erreicht, so wurde auch die Verbindung mit der Bombe gedichtet, und der Apparat, wie bereits erwähnt, in den Brutschrank gebracht. Nach einem 20—24 stündigen Aufenthalt daselbst wurde zunächst stets der vorhandene Druck kontrolliert. Hatte er abgenommen, war also der Verschlufs nicht dicht gewesen, was bei hohen Druckgröfsen öfters der Fall war, so wurde der Versuch wiederholt. So wurden, vom normalen atmosphärischen Druck ansteigend, diejenigen Druckhöhen festgestellt, bei denen auch die widerstandsfähigsten Keime nicht mehr zur Entwicklung zu gelangen vermochten.



Meine Versuchsergebnisse sind in Tabelle I und Figur I niedergelegt. In der ersten Tabelle, dem eigentlichen Protokoll, sind die Druckhöhen, die zur Anwendung kamen, einzeln ersichtlich. In ihr sind für jeden Versuch zwei Rubriken in Ansatz gebracht, von denen die erste, z. B. I A., das Verhalten der Bakterien bei dem Kohlensäuredruck von 1 Atmosphäre, die zweite, *L*, den Befund der Agarplatte zeigt, nachdem sie dieser CO_2-Atmosphäre entzogen und mehrere Tage in der atmosphärischen Luft im Brutschrank gewesen war. + bedeutet Wachstum, — Hemmung oder Abtötung, je nachdem nachträglich noch ein Wachstum konstatiert werden konnte oder nicht. In der zweiten Tabelle sind die Druckhöhen graphisch dargestellt und bietet sie eine bessere Übersicht. Die dunkle Strichelung zeigt die Zone an, in der unter der Einwirkung der CO_2 noch Wachstum stattfand, die hellere, in der nach 24stündiger Einwirkung der CO_2 noch in der atmosphärischen Luft ein Auskeimen der Bakterien zu konstatieren war (Hemmungszone). Bei Anwendung höherer Drucke, als in letzterer zum Ausdruck gebracht, wurde keine Entwicklung von Kolonien mehr beobachtet. (Abtötungszone).

Die durch die früheren Versuche erwiesene verschiedene Resistenz einzelner Bakterienarten tritt erst recht deutlich bei der Anwendung erhöhter Drucke zutage. Nach meinen Versuchen mufs ich die untersuchten Bakterien in drei Gruppen einteilen.

Der Repräsentant der ersten ist der Choleravibrio. Abweichend von den Ergebnissen Fränkels konnte ich bei dem von mir untersuchten Stamm nach 24stündiger stationärer Einwirkung der CO_2 stets nur völlige Abtötung feststellen, die Versuche wurden in dieser Richtung mehrfach ausgeführt, hatten aber stets dasselbe Resultat. Für den Cholerakeim mufs daher die CO_2 nach meinen Versuchen als ein absolut bakterizides Agens angesehen werden.

Die zweite Gruppe, die den Milzbrandbazillus und drei Stämme des Bazillus faecalis alcaligenes umfafst, weist die Bakterien auf, die bei Anwesenheit der CO_2 nicht zu wachsen

Tabelle I. CO_2-Ein-

A = Atmosphäre Kohlensäure, L = gewöhnliche atmosphärische Luft

Bakterienart	0 A	L	1/4 A	L	1/2 A	L	1 A	L	1½ A	L	2 A	L	2½ A	L	3 A	L	4 A	L
Typhusbazillus M.	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−
» » K.	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−
» » Sch.	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−
Koli bazillus Aue	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−
» » F.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−
» » I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−
» » II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−
Paratyphus bazillus A.	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−
» » B.	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−
Cholera vibrio S.	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Bacillus enteritidis Gärtner	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−
Bacillus Dysenterie Flexner	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−
» » Shiga	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−
Proteus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	−
Staphylococcus aureus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	−
Milzbrandbazillus	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Bacillus faecalis alcaligenes I	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
» » » II	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
» » » St.	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Bacillus pyocyaneus	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−

vermögen, aber durch letztere nicht abgetötet werden, sondern bei besseren Lebensbedingungen wieder auskeimen, auch wenn ein Druck bis zu einer Atmosphäre CO_2 während 24 Stunden auf ihnen ruhte. Wurde dieser Schwellenwert überschritten, so waren auch sie nicht mehr vermehrungsfähig und müssen deshalb wohl als abgetötet angesehen werden.

Die Mehrzahl der untersuchten Keime war imstande, auch während der Einwirkung des Gases sich zu vermehren und auf der Agaroberfläche einen sichtbaren Rasen zu bilden. Die Grenze, bei der ein derartiges Wachstum noch sichtbar war, lag bei den meisten Keimen bei einer Atmosphäre, nur die Koliarten, sowie der Bacillus enteritidis Gärtner und in geringerem Maſse der Staphylococcus pyogenes aureus und der Proteus lieſsen sich auch bei höheren Konzentrationen (bis zu 2 Atm.) im Wachstum nicht sonderlich beeinflussen. Entsprechend dieser gröſseren

wirkung auf Bakterien.
(Brutschrank 37°), + = Wachstum, – = Hemmung, bzw. Abtötung.

5 A	L	6 A	L	7 A	L	8 A	L	9 A	L	10 A	L	11 A	L	12 A	L	13 A	L	14 A	L	15 A	L	16 A	L	17 A	L	18 A	L	19 A	L	20 A	L
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–								

Wachstumsenergie mufste auch der Druck, welcher eine Abtötung der Keime herbeiführen sollte, erheblich erhöht werden. Von den pathogenen Keimen ist es zunächst der Typhusbazillus mit den ihm verwandten Paratyphusbazillen, welche der Einwirkung der CO_2 erlagen; in geringen Abständen folgen die anderen pathogenen Darmbakterien, der Bacillus enteritidis Gärtner und die beiden Erreger der Dysenterie. Das Kolibakterium erwies sich als die resistenteste Bakterienart. In dem Verhalten der einzelnen Kolistämme zeigt sich eine so erhebliche Differenz, dafs auch auf Grund dieser Beobachtung die Annahme, dafs unter den als Kolibakterien bezeichneten Mikroorganismen eine Gruppe von Bakterien sich birgt, die nur in einzelnen Punkten ihres morphologischen und biologischen Verhaltens verwandtschaftliche Eigenschaften zeigen, ihre Bestätigung finden dürfte. Der höchste Druck, der angewandt werden mufste,

um von den 4 Kolistämmen den resistentesten abzutöten, betrug 15 Atm., während für 2 schon 9 genügten.

Dafs es nicht der Druck in dieser Höhe an und für sich ist, der die schädigende Wirkung auf die Bakterien ausübt, sondern diese in einer spezifischen Eigentümlichkeit der CO_2 zu

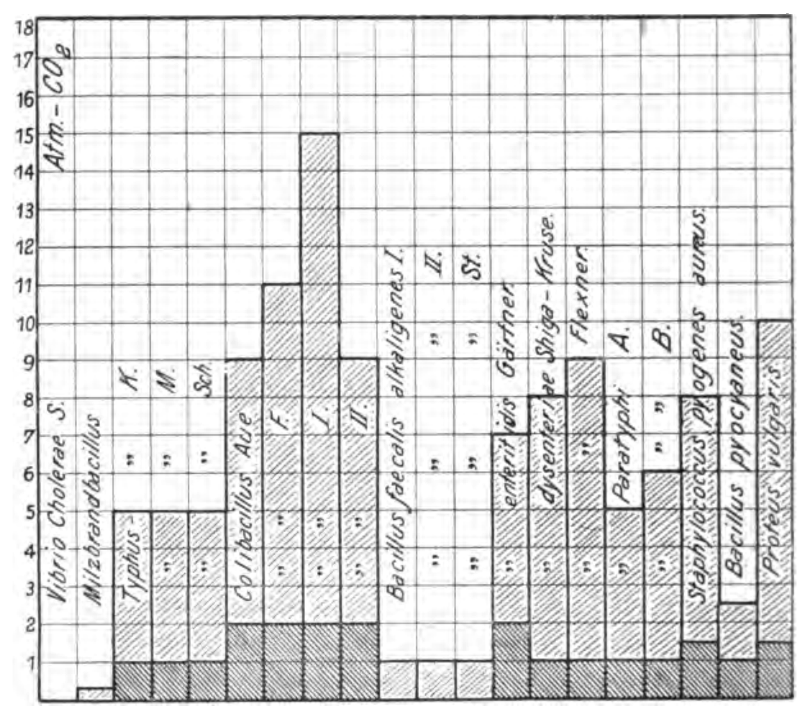


Fig. 1.

Einwirkung der Kohlensäure auf Bakterien.
Atm. CO_2 = Atmosphäre Kohlensäure; dunkle Strichelung = Zone, in der unter Einwirkung der CO_2 Wachstum stattfindet; helle Strichelung = Zone, in der nach 24stündiger Einwirkung der CO_2 noch in der gewöhnlichen Luft ein Wachstum eintritt.

suchen ist, zeigen Versuche, die von Roger[22]) unter Anwendung aufserordentlich hoher Luftdrucke angestellt wurden, ferner ein Vergleich mit meinen Untersuchungen über den Einflufs des Sauerstoffs und des Wasserstoffs, die weiter unten angeführt werden.

Nach Roger vertragen der Staphylococcus aureus, das Bac. coli, Streptococcus erysipelatis und der Bacillus anthracis mit und ohne Sporen ohne weiteres einen 5—10 mal schnell hintereinander eintretenden Wechsel eines Drucks von einer und 250 Atm., ebenso einen 5—6 Minuten anhaltenden Druck von 1000 Atm., durch den auch Wasserbakterien, die im Wasser des Apparates sich befanden, nicht geschädigt wurden. Wurde der Druck innerhalb 10 Minuten allmählich auf 3000 Atm. erhöht und 2 Minuten auf dieser Höhe gehalten, dann plötzlich auf Atmosphärendruck erniedrigt, so zeigten sich Unterschiede im Verhalten der Keime. Der Staphylococcus aureus und das Bacterium coli blieben unbeschädigt, vom Streptococcus erysipelatis starb ein Teil ab, der Rest vermehrte sich langsamer. Nach Suchsland [23]) brachte ein Druck von 200 Atm. während 8 Minuten und von 230 Atm. 1 Minute lang keine Änderung in der Intensität der Phosphoreszenz zweier phosphoreszierender Bakterien hervor.

II. Die Wirkung des Sauerstoffs.

Über die Bedeutung, die dem freien Sauerstoff der Atmosphäre in dem Leben der Mikroorganismen zukommt, ist eine umfangreiche Literatur entstanden, nachdem im Jahre 1861 Pasteur die Entdeckung gemacht hatte, dafs es ein Bakterium, Vibrion butyrique, gäbe, das bei einer normalen Lebensführung den Sauerstoff entbehren könne, ja durch diesen sogar in seiner Existenz geschädigt würde. Nach ihrem Verhalten zum Sauerstoff schied er die Bakterien in aerobe und anaerobe, eine Einteilung, die unter Hinzufügung einer dritten Gruppe, der fakultativ anaeroben, noch jetzt allgemein bräuchlich ist, vom exakt wissenschaftlichen Standpunkte aus sich aber nach den neueren Erfahrungen nicht mehr halten läfst. Sie reicht nicht aus, wenn das Minimum, Optimum und Maximum der Sauerstoffspannung in genügender Weise berücksichtigt wird.

Schon seit längerer Zeit ist durch Versuche dargetan, dafs für einzelne Arten innerhalb der drei genannten grofsen Gruppen

das Optimum der Sauerstoffspannung sehr verschieden ist. In sehr anschaulicher Weise ist dies vornehmlich für die aeroben Bakterien durch die »Bakterienmethode« Engelmanns[24]) und die »Atmungsfiguren« Beijerincks[25]) erwiesen. Beide Methoden zeigen, wie verschiedenartige, eigenbewegliche Bakterien, entsprechend ihrem Sauerstoffbedürfnis in gröfserem oder kleinerem Abstand von einer Sauerstoff spendenden Quelle sich anordnen und so mikro- oder makroskopisch sichtbare scharf getrennte Zonen bildet. In flüssigen Kulturen, in Reagensgläsern, werden die Atmungsfiguren als Bakterienniveaus beobachtet, d. h. als scharf begrenzte, dünne Schichten von Bakterien, die in der klaren Flüssigkeit in einer vom Sauerstoffbedürfnis abhängigen Höhe stehen. Unter wechselnden Spannungen bewegen sich die Keime von einer Zone zur andern, und es fällt oder steigt das Bakterienniveau, indem es sich stets in die Zone der optimalen Sauerstoffspannung einstellt.

Allerdings ist durch völlig einwandfreie Versuche von Nencki, Lachewicz[26]), Beijerinck[27]) und Kabrhel[28]) nachgewiesen worden, dafs es Bakterienarten gibt, die in einer Atmosphäre üppig wachsen können, in denen durch die feinsten Reagentien Sauerstoff nicht mehr nachzuweisen war, in denen auch obligat aerobe Keime nach kurzer Zeit zugrunde gingen. Die von diesen Untersuchern nach längerem Abkochen angenommene absolute Sauerstofffreiheit des Nährbodens scheint jedoch nach den neueren Untersuchungen von Fermi und Bassu[32]) nicht erreichbar zu sein. Aber dieser Sauerstoffabschlufs stellte nach den Untersuchungen Beijerincks[29]) keineswegs das Optimum der Existenzbedingungen dar, bei Gegenwart allerdings sehr minimaler Mengen Sauerstoffs zeigte sich ein erheblich besseres Wachstum. Für eine Reihe von als obligat anaerob bezeichneten Arten ergaben sich nach den Untersuchungen Chudiakows[30]) folgende Sauerstoffmaxima:

Bacterium butyricum 5 mm Luftdruck (0,13 % Sauerstoff) noch lebhaft wachsend,

» » 10 mm Luftdruck, sehr schwach wachsend,

Bacterium butyricum 15 mm Luftdruck und darüber kein Wachstum mehr;

die obere Grenze des Luftdrucks, die noch normale Entwickelung zuliefs, war 5 mm.

Clostridium butyricum . .	10 mm	Luftdruck
Bac. oedematis maligni . .	20 »	»
Bac. tetani	20 »	»
Bac. Chauvei	40 »	»

Wichtig ist auch der Nachweis desselben Untersuchers, dafs bei dem geringen Luftdruck, welcher die Entwickelung der Anaeroben noch zuläfst, der Sauerstoff für dieselben nicht etwa indifferent bleibt, sondern von ihnen auch in ihrem Stoffwechsel hineingerissen und verbraucht wird.

Chudiakow zeigte auch, was bezüglich des Bac. tetani schon bekannt war, dafs es möglich ist, die Anaeroben bei fortgesetzter Züchtung unter langsam steigendem Sauerstoffdruck an den zehnfach höheren Sauerstoffgehalt zu gewöhnen, wie sie ihn normalerweise vertragen. Es gelang ihm auf diesem Wege, seine strengsten Anaeroben, das Bacterium butyricum schliefslich soweit zu bringen, dafs er bei einem Luftdruck von 50 mm (also zehnmal mehr, als es normalerweise vertrug) sich gut entwickelte. Umgekehrt liefs sich diese, an das Leben bei 50 mm Luftdruck gewöhnte Art durch längeren Aufenthalt im Vakuum ihre frühere Empfindlichkeit gegen Sauerstoff wieder anerziehen. Bezüglich der Einwirkung der Sauerstoffatmosphäre auf anaerobe Bakterien ergaben die an Bacterium butyricum ausgeführten Versuche, dafs eine einstündige Einwirkung kaum schädigte, vierstündige und längere Lüftung verminderte, fünfzehnstündige unterdrückte jedes Wachstum. Die reifen, anaerob entstandenen Sporen wurden gleichfalls, der Länge der Exposition entsprechend, geschwächt, nach 265 Tagen war die Schwächung erheblich. Die schädigende Wirkung des Sauerstoffs trat bei höheren Temperaturen schneller in die Erscheinung als bei niederen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde von Chudiakow das Verhalten des als besonders aerob geltenden Bac. subtilis

gegen niedere Sauerstoffdrucke geprüft. Diese Keimspezies wuchs noch bei 10 mm, aber nicht mehr bei 5 mm Luftdruck. Ähnlich verhielten sich mehrere Schimmelpilzarten und das Clostridium viscosum; letzteres entwickelte sich noch kümmerlich bei 5 mm Luftdruck. Auf Versuche, die über das Verhalten von aeroben Keimen gegenüber der absoluten Sauerstoffentziehung unter Anwendung von Wasserstoff angestellt wurden, werde ich in dem dritten Teil dieser Arbeit näher eingehen.

Nach diesen Beobachtungen müssen die prinzipiellen Gegensätze, die früher zwischen den Aeroben und den Anaeroben angenommen wurden, fallen gelassen werden. Zwischen diesen Gruppen bestehen nur quantitative Unterschiede, deren Grenzen sich durch Anpassung verschieben lassen. Während die obligat anaeroben Bakterien, das Optimum der Lebensbedingung in einem Minimum der Sauerstoffspannung finden, liegt für die Aeroben dieses Optimum durchweg in der höchsten Sauerstoffkonzentration, die die atmosphärische Luft in dem Partiärdruck des Sauerstoffs zu bieten vermag.

Auch den Einfluſs höherer Sauerstoffdrucke sucht Chudiakow auf zwei Bakterienarten festzustellen. Der Bac. subtilis wuchs bei seiner Kultur in Glyzerinpepton noch bei 3 Atmosphären, nicht aber bei 4, das fakultativ anaerobe Chlostridium viscosum entwickelte sich in Peptonlösung ohne Glyzerinzusatz noch bei 2,5 Atmosphären, während in der Glyzerinpeptonlösung wohl noch bei 1 Atmosphäre, nicht mehr bei 2, Wachstum zu konstatieren war. Durch 4 Atmosphären und 14tägige Einwirkung wurde letzteres abgetötet, der Bac. subtilis dagegen blieb unter diesen Umständen noch lebensfähig. Chudiakow nimmt daher den Schwellenwert der Sauerstoffspannung für die fakultativ anaeroben Bakterien niedriger als für die obligat anaeroben, eine Verallgemeinerung, die nach meinen Untersuchungen nicht zulässig ist.

Meine Versuche über den Einfluſs des Sauerstoffs bei verschiedenen Druckhöhen wurden genau in derselben Weise ausgeführt, wie sie bereits in dem ersten Teil dieser Abhandlung

bezüglich der CO_2-Versuche geschildert wurden. Mit Ausnahme eines Typhusstammes (Typhus 151) waren es dieselben Bakterienspezies, die der Prüfung unterworfen wurden. Nach Beschickung der Agarplatten mit 1—2 Ösen 24stündiger Bouillonkulturen wurden sie bei den Versuchen unter atmosphärischem Druck im Anaerobenapparat, bei höheren im Autoklaven dem Sauerstoff ausgesetzt. Nach 24stündiger Einwirkung des Gases bei 37° wurden die Agarplatten, falls bis dahin ein kräftiges Wachstum sich nicht gezeigt hatte, in der atmosphärischen Luft im Brutschrank aufbewahrt bis entweder ein Rasen sichtbar wurde oder bei dem Ausbleiben dieses die Abtötung als sicher angenommen weden konnte. Das Gas wurde einer Bombe entnommen, die von einer hiesigen Firma den »Sauerstoffwerken« geliefert war.

Tabelle II zeigt das Protokoll, Figur 2 eine graphische Darstellung der Druckhöhen.

Ein Blick auf die Figur 2 zeigt uns, dafs die Wirkung des Sauerstoffes durchweg nicht der der Kohlensäure gleichkommt. Es gibt unter den von mir untersuchten Bakterienarten keine, die nicht noch in reiner Sauerstoffatmosphäre zu wachsen vermögen, alle sind sie imstande, auch eine höhere Konzentration dieses Gases zu überwinden. Auffällig ist, dafs gerade die sauerstoffbedürftigsten Spezies, der Choleravibrio, der Milzbrandbazillus und die Bac. faecalis alcaligenes-Stämme nur in verhältnismäfsig engen Grenzen diese erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ertragen können, eine Beobachtung, die mit der von Chudiakow gemachten in Widerspruch steht. Mit nur wenigen Ausnahmen liegt die Grenze, innerhalb der noch Wachstum bei direkter Sauerstoffeinwirkung beobachtet werden konnte, höher als bei der Kohlensäure, doch sind diese Unterschiede nicht so erheblich, dafs sie die gewaltigen Differenzen, die hinsichtlich der Hemmung festgestellt werden konnten, erklären lassen. Während in der Kohlensäureatmosphäre von 15 Atmosphären Druck auch die resistentesten der untersuchten Keimarten, die Kolibakterien, abgetötet wurden, konnte ein Sauerstoffdruck von 75 Atmosphären, der für den Apparat höchst zulässige Druck, eine gröfsere Anzahl von Keimen nicht derart schädigen, dafs sie nicht noch nachträglich in der

Tabelle II. Einwirkung

A = Atmosphäre Sauerstoff, L = gewöhnliche atmosphärische

Bakterienart	0 A	L	1/2 A	L	3/4 A	L	1 A	L	1½ A	L	2 A	L	2½ A	L	3 A	L	4 A	L	5 A	L	6 A	L	7 A	L
Vibrio Cholera S.	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Milzbrandbazillus	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	
Typhusbazillus R.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
» M.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
» 151	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
Coli bac. Aue	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
» F.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
» I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
» II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
Bac. faec. alcalis I	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
» » » II.	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
» » » St.	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Bac. enteritid. Gärtner	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
Bac. Dysent. Shiga	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−
» » Flexner	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
Bac. Paratyphus A.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
» » B.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	·
Staphylococcus pyogenes aureus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+
Bac. pyocyan.	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
Proteus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+

atmosphärischen Luft sich vermehrten. Eigentümlicherweise steht die Zone, in der unter der Sauerstoffwirkung noch Wachstum stattfindet, in keinem Verhältnis zu der Hemmungszone und zwar tritt dies besonders deutlich bei den bereits genannten sauerstoffbedürftigen Keimen, dem Cholera vibrio, Milzbrandbazillus und Bac. faecalis alcaligenes in die Erscheinung. Letzterer wächst noch in einem $1/2$ atmosphärigen Sauerstoffüberdruck, wird aber schon in einem $1^1/_2$ bzw. 2 atmosphärigen abgetötet. Der Choleravibrio und der Milzbrandbazillus zeigen noch bei einer bzw. $3/4$ Atm. Wachstum, sterben aber schon bei einem minimal höheren Druck von $1^1/_2$ bzw. 1 Atm. ab. Abnorme Verhältnisse zeigt der eine Dysenteriestamm, der in denselben Grenzen wie der Bac. faecalis alcaligenes noch wächst, aber erst durch einen

des Sauerstoffs auf Bakterien.

Luft, + = Wachstum, — = Hemmung bzw. Abtötung.

8 A	L	9 A	L	10 A	L	15 A	L	20 A	L	25 A	L	30 A	L	35 A	L	40 A	L	45 A	L	50 A	L	55 A	L	60 A	L	65 A	L	70 A	L	75 A	L
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—
—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+

Druck von 30 Atm. abgetötet wird. Die gröfste Wachstumsenergie in der Sauerstoffatmosphäre weist der Staphylococcus pyogenes aureus auf, seine Abtötung erfolgt aber früher als bei den Kolibakterien, dem Bac. paratyphi B und dem Proteus. Die Typhusstämme sowie der Bac. dysenteriae Flexner nehmen eine Mittelstellung ein.

Bezüglich des Sauerstoffs ergeben sich demnach dieselben Verhältnisse, wie für die Nährböden überhaupt, worauf Rubner[31]) in seiner Abhandlung »Die Beziehungen zwischen Bakterienwachstum und Konzentration der Nährung (Stickstoff- und Schwefelumsatz) besonders hingewiesen hat. Wie es bei den Nährböden Grenzen der Konzentration gibt — nach Rubner lag z. B. für eine Proteusart die Grenze der Hemmung bei 23 %

Fleischextrakt (= 30 % frische Substanz), so ist auch bei einer gewissen höheren Konzentration des Sauerstoffs ein Wachstum

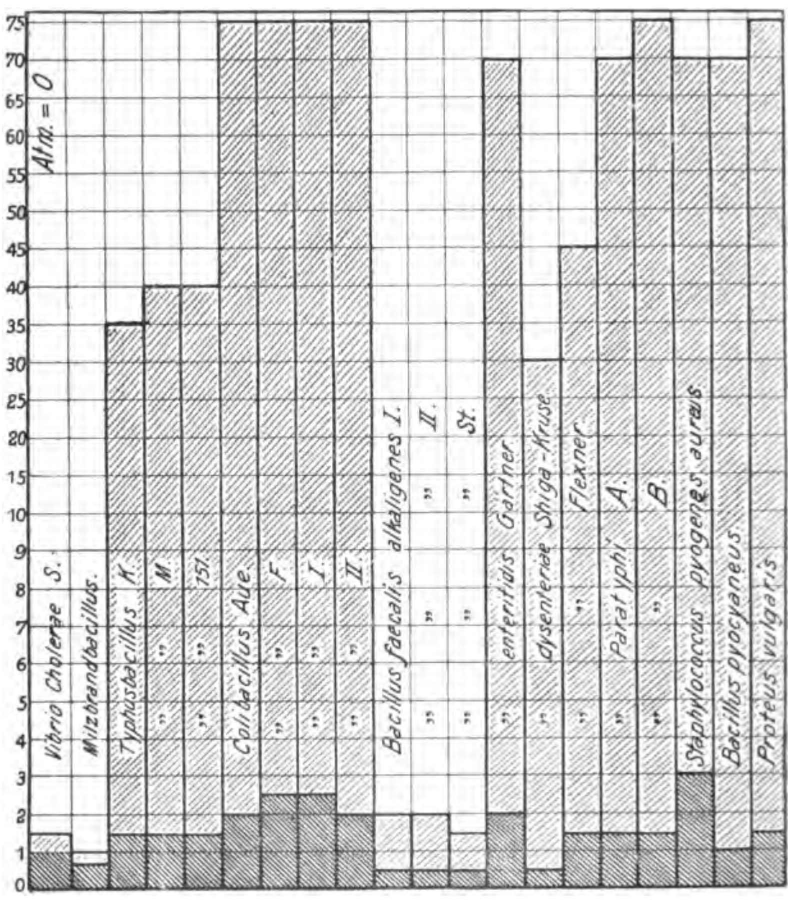


Fig. 2.

Einwirkung des Sauerstoffs auf Bakterien.

Atm. 0 = Atmosphäre Sauerstoff; dunkle Strichelung = Zone, in der unter Einwirkung des Sauerstoffs noch Wachstum stattfindet; helle Strichelung = Zone, in der nach 24stündiger Einwirkung des Sauerstoffs in gewöhnlicher Luft noch ein Wachstum eintritt.

nicht mehr möglich, eine Grenze nach unten gibt es aber überhaupt wohl weder für die Nährböden noch den Sauerstoff.

III. Wirkung des Wasserstoffs.

Bezüglich der Wirkung des Wasserstoffs auf die Lebenstätigkeit der Bakterien bleibt nur noch wenig zu berichten. Seine Unschädlichkeit, die bereits seit seiner Einführung in die Bakteriologie bekannt ist, wurde auch durch meine Versuche bei Anwendung erheblicher Druckhöhen bestätigt. Allerdings kann diese Indifferenz nicht für alle Bakterien in gleichem Mafse in Anspruch genommen werden. Ungünstig mufs selbstverständlicherweise der Wasserstoff auf die Bakterien einwirken, wenn er ihnen andere Gasarten, die vorteilhafter für ihre Lebenstätigkeit sind, entzieht. So sollten obligat aerobe Keime in einer reinen Wasserstoffatmosphäre nicht wachsen können, höhere Konzentrationen müssen diese Keime, entsprechend ihrem Sauerstoffbedürfnis, beeinflussen und so indirekt Schädigungen bedingen. Eine Beteiligung dieses Gases an dem Lebensprozefs selbst ist bisher nicht nachgewiesen, ausgenommen, wenn es in statu nascendi durch Zerlegung anderer Verbindungen indirekt günstigere Nährmedien schafft. Die Anordnung bei meinen Versuchen, bei denen ich eine gröfsere Zahl der verschiedensten Keimarten dem Wasserstoff aussetzte, war dieselbe, wie sie bereits im ersten Teil des Aufsatzes beschrieben wurde. Hervorheben möchte ich noch, dafs der Nähragar erst zur Platte ausgegossen wurde, nachdem er einige Zeit ($^1/_4$—$^1/_2$ Stunde) im kochenden Wasser gestanden hatte, um so möglichst jede Spur Sauerstoff aus ihm zu entfernen. Sofort nach dem Erkalten wurden die Platten mit den 24stündigen Bouillonkulturen besät und in den Autoklaven gebracht. Der zur Pression verwendete Wasserstoff entstammte Bomben und war frei von Sauerstoff, wie die Untersuchung ergab. Wie in den früheren Versuchen, so wurde auch jetzt der Apparat peinlichst durch einen kräftigen, mehrere Atmosphären starken Wasserstoffstrom längere Zeit ausgewaschen, so

dafs mit Sicherheit angenommen werden konnte, dafs der Sauerstoff der Luft völlig aus ihm entfernt sei. Diese Annahme fand ihre Bestätigung, als zur Kontrolle nach 24 Stunden ein Teil des Gases auf dem Apparat aufgefangen und auf Sauerstoff untersucht wurde. Die alkalische Pyrogallollösung zeigte keine bräunliche Verfärbung, demnach war in der die Agarplatten umgebenden Atmosphäre kein Sauerstoff mehr vorhanden. Es käme also nur noch der Sauerstoff in Betracht, der nach Angabe von Fermi und Bassu[32]) selbst durch Abkochen niemals aus den Nährböden, besonders dem Agar, entfernt werden kann, so dafs also in praxi niemals mit einer absoluten Anaerobiose zu rechnen wäre; sämtliche frühere Beobachtungen über das Leben von Mikroorganismen in einer sauerstofffreien Atmosphäre müssen, fallls diese Angaben sich bestätigen sollten, damit hinfällig werden.

Zusammenstellung 3.

Einwirkung des Wasserstoffs auf Bakterien.

Lfd. Nr.	Bakterienart	Anzahl der Atmosphär.	Dauer der Einwirkung	Temperatur	Wirkung
			Std		
1	Bact. Coli F. . . .	75	24	37°	kräftig. Wachstum
2	Bact. Coli I	»	»	»	do.
3	Bac. Typhi K. . . .	»	»	»	do.
4	» » D. . . .	»	»	»	do.
5	» Paratyphi A. .	»	»	»	do.
6	» » B.. .	»	»	»	do.
7	» Dysenteriae Flexner.	»	»	»	do.
8	» Dysenter. Shiga-Kruse. . . .	»	»	»	do.
9	» Dysent. Shiga II	»	»	»	do.
10	» Enteritidis Gärtner.	»	»	»	do.

Fortsetzung der Zusammenstellung 3.

Lfd. Nr.	Bakterienart	Anzahl der Atmosphär.	Dauer der Einwirkung	Temperatur	Wirkung	
			Std.			
11	Bac. faecalis alcalig..	75	24	37°	kräftig. Wachstum	
12	Proteus vulgaris . .	»	»	»	do.	
13	Cholera-Vibrio S.. .	»	»	»	kräftig. Wachstum u. Indolbildung	
14	» » V. . .	»	»	»	do.	
15	El Tor II	»	»	»	kräftig. Wachstum u. starker Indolgeruch	
16	» » III	»	»	»	do.	
17	» » IV	»	»	»	do.	
18	» » V.	»	»	»	do.	
19	» » VI.	»	»	»	schwach. Wachstum	
20	Bac. Pyocyaneus . .	»	»	»	kräftig. Wachstum u. Farbstoffbildung	
21	Milzbrandbazillus . .	»	»	»	gutes Wachstum	
22	» sporen an Seidenfäden	»	»	»	do.	
23	Staphylococcus pyogenes aureus	»	»	»	do.	
24	Bac. Dyphtheriae . .	»	»	»	kümmerlich	auch auf Ascitesagar konnte eine deutliche Hemmung festgestellt werden, nach 48 Stdn. kräftigere Entwicklung
25	Bac. Influencae . .	60	»	»	gutes Wachstum auf Taubenblutagar	
26	Meningococcus . .	»	»	»	kräftig. Wachstum auf Ascitesagar	
27	Streptococcus pyog. .	»	»	»	gut. Wachstum, sehr kräft. a. Ascitesagar	
28	Bacillus fluorescens liquefac.	75	»	26°	kräftig. Wachstum und Fluorescens	
29	Bac. fluorescens non liquefac.	»	»	»	kräftig. Wachstum und Fluorescenz	Fluoreszenz trat auch bei den in atmosphär. Luft gehaltenen Kulturen erst am zweiten oder dritten Tage ein.
30	Bac. subtilis	»	»	»	do.	
31	» lact. aerogenes .	»	»	»	do.	
32	» Acidi lactici . .	»	»	»	do.	
33	» Prodigiosus . .	»	»	»	kräftig. Wachstum m. Farbstoffbildung	
34	» Ruber Kiel . .	»	»	»	do.	
35	» Cyanogenes . .	»	»	»	kräftig. Wachstum	wie bei 29.
36	» Pyocyaneus . .	»	»	»	kräftig. Wachstum m. Farbstoffbildung	
37	Spirillum volutans .	»	»	»	schwach. Wachstum	

Alle untersuchten Bakterien vermochten demnach in einer sauerstofffreien Atmosphäre sich zu vermehren. Durchweg war jedoch das Wachstum unter dem Wasserstoff nicht so intensiv als bei gleichen Kulturen, die unter aeroben Verhältnissen gehalten wurden, der gebildete Rasen war mehr flächen- und schleierförmig und von geringerer Dicke. Obligataerobe Keime nach der althergebrachten Anschauung waren somit nicht vorhanden, es mufste allen der Sauerstoff genügen, der nach den Untersuchungen von Fermi und Bassu im Nährboden zurückgeblieben war. Ob dieser aber als einzige Quelle für ihre Lebensenergie anzusehen ist, möge dahingestellt sein; vielleicht hält man die Annahme für zulässig, dafs die lebenskräftigen Individuen bei günstigen Aufsenbedingungen in ihrem Innern eine gewisse kleinste Sauerstoffreserve aufspeichern können, die sie in der Karenzzeit zu verwerten imstande sind, ähnlich wie Pfeffer[33]) dies bei den farbstoffbildenden Bakterien feststellen konnte. Ferner mufs daran gedacht werden, dafs eben fermentative Prozesse auf dem Nährboden eintreten können.

Unter den angeführten Keimarten finden sich aber auch solche, die nach unseren bisherigen Anschauungen als absolut aerob galten, so z. B. der Influenza- und der Diphtheriebazillus.

Letzterer zeigte zwar deutlich eine Hemmung im Wachstum gegenüber den in der atmosphärischen Luft gehaltenen Kulturen, ersterer dürfte in dem sauerstoffhaltigen Blut hinreichend günstige Lebensbedingungen gefunden haben; seine in der Wasserstoffatmosphäre gebildeten Kolonien differierten nur um ein geringes von den aerob gewachsenen. Auch andere Lebensäufserungen, so die Farbstoffbildung, blieben, wie die Zusammenstellung zeigt, nicht aus, wenngleich sie auch weniger kräftig waren; der Choleravibrio und vier von fünf El Tor-Stämmen produzierten, wie am Geruch festgestellt werden konnte, Indol.

Die von mir beobachtete und nach Lage der Versuchsanordnung nur schätzungsweise angegebene Beeinträchtigung im Wachstum, bedingt durch den Mangel an Sauerstoff, findet in den Untersuchungen Willimskys[34]) eine Stütze, die dieser im hiesigen Institut ausführte. Der Choleravibrio, der Bac. fae-

calis alcaligenes und der Bac. fluorescenz non liquefaciens wuchsen in ungespanntem Wasserstoff zwar zu Kolonien aus, deren Gröfse jedoch gegenüber den aerob gehaltenen Kulturplatten zurückblieb. Quantitative Bestimmungen ergaben, dafs der Bac. fluorescenz non liquefaciens nach achttägiger mittelst Wasserstoff hergestellter Anaerobiose in der Wachstumsintensität um $^1/_3$ gelitten hatte. Aerob gewachsene Rasen der obengenannten drei Keimarten, die nachher 24 Stunden in reiner Wasserstoffatmosphäre gehalten wurden, wiesen bei dem Choleravibrio und Bac. alcaligenes nur noch 65% und dem Fluorescenz noch 57% lebens- und vermehrungskräftige Individuen auf.

Der Druck an und für sich übte in den von mir angewandten Konzentrationen anscheinend keinerlei Wirkung auf die Bakterien aus, wie bereits auch im ersten Teil des Aufsatzes des näheren ausgeführt wurde.

Literatur.

1. Hoffmann, Arch. f. Hygiene, Bd. LVII.
2. d'Arsonval, Comptes rendus de l'Académie des sciences de Paris. Tome CXII, 1891.
3. Sabrazès und Bazin, Comptes rendus de la soc. de biol. 1893.
4. Schaffer und E. v. Freudenreich, Annales de Micrographie, IV.
5. d'Arsonval und Charrin, Comptes rendus de la soc. de biol., 1893.
6. Sohnke, Zeitschr. f. Mineralwasserfabrikation, 1886.
7. Pfuhl, Deutsche militärärztliche Wochenschrift, 1886.
8. Hochstetter, Arb. aus dem Kaiserl. Ges.-Amt, 1887.
9. Leone, Arch. f. Hygiene, 1886.
10. Scola und Alessi, Estratto d. Bull. d. Reg. Accad. med. Roma, 1889—1890.
11. Hellwig, Die Typhusepidemie in Mainz im Sommer 1884. Mainz, 1885.
12. Dräer, Zentralblatt f. allgemeine Gesundheitspflege, 14.
13. C. Fränkel, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. V.
14. Pasteur und Joubert, Étude sur la maladie charbonneuse. Comptes rendus, 1877.
15. Szpilmann, Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. phys. Chemie, 1880.
16. Buchner, Archiv f. Hygiene, 1885.
17. Liborius, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 1.
18. Schottelius, Biolog. Untersuchungen über den M. prodigiosus.
19. Frankland, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. VI.

20. Sirotinin, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. IV.
21. Bischoff, Veröffentlichungen auf dem Gebiete des Militär-Sanitätswesens, Heft 23.
22. Roger, Compt. rend. d. séanc. d. l'Acad. des scienc. de Paris, 1894.
23. Suchsland, Physikalische Studien über Leuchtbakterien. Halle, 1898.
24. Engelmann, Botan. Zeitung 1881, 1882, 1888.
25. Beijerinck, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 14, 1893.
26. Nencki und Lachowicz, Pflüger, Arch. f. Physiologie, Bd. 33, 1884.
27. Beijerinck, ref. Kochs Jahresbericht d. Gärungsorganismen, 1893.
28. Kabrehl, Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 25, 1899.
29. Beijerinck, ref. Zentralblatt f. Bakt., Bd. 25, 1899.
30. Chudiakow (russisch) ref. Zentralblatt f. Bakt., II. Abtlg., Bd. 4, 1898.
31. Rubner, Arch. f. Hygiene, Bd. 57.
32. Fermi und Bassu, Zentralblatt f. Bakt., Bd. 35.
33. Pfeffer, Ber. d. Kgl. Sächs. Gesellsch. d. Wissensch., ref. Baumgartens Jahresbericht, 1896.
34. Willimsky, Arch. f. Hygiene, Bd. LIV.

Über das Eindringen von Bakterien in das Hühnerei durch die Eischale.

Von

Dr. med. **R. Lange**-Berlin.

(Aus den Hygienischen Instituten der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. M. Rubner.)

Auf Anregung von Herrn Geheimrat Rubner habe ich durch eine gröfsere Reihe von Versuchen der Frage näher zu treten versucht, ob lebende Bakterien die Fähigkeit besitzen, die unverletzte Eiwand der Hühnereier zu durchwandern und bis in das Eiinnere vorzudringen, sich hier zu vermehren und durch ihre Lebenstätigkeit eine Gefahr für den Menschen zu bilden. Falls diese Versuche im bejahenden Sinne ausfielen, sollten sich einige andere anschliefsen, wie lange und bis zu welchem Hitzegrade ein derartig infiziertes Ei bis zur Beseitigung der Infektionsgefahr erwärmt werden mufs.

Die grofsen Mifsstände im heutigen Eierhandel setze ich als bekannt voraus und verweise auf die neuesten Arbeiten von K. Borchmann(1) und Sachs-Müke(2). Ersterer hat eine sehr genaue Übersicht der Gesamtliteratur gebracht.

Bevor ich auf meine Resultate zu sprechen komme, möchte ich einige Bemerkungen über die Versuchstechnik vorausschicken. Die einzelnen Teile des Eies, wie Aufsenschale, Eihaut, Eiweifs

und Eigelb habe ich mit gesonderten und frisch ausgeglühten Instrumenten entnommen. Die Eier selbst sind von der beginnenden Desinfektion bis zur vollendeten Präparation nur mit ausgeglühter Zange auf steriler Petrischale gehalten worden.

Die untersuchten Eier sind 24 Stunden alte (in den Tabellen als frisches Stallei bezeichnet) sowie als »Trinkeier« abgestempelte, ferner Kalkeier und schlieſslich sehr alte Fleckeier mit wandständigem Dotter und groſser Luftblase. Desinfiziert habe ich sie in folgender Weise. Zunächst habe ich jedes Ei unter dem laufenden Strahl der Wasserleitung mit Bürste und Seife 5 Minuten lang gründlich vom Schmutz gesäubert. Dann mit einem Wattebausch in einer Glasschale mit genügender Menge Äther, in einer zweiten mit absolutem Alkohol tüchtig abgerieben, darauf eine Stunde in einer Sublimatlösung 1 : 1000 ohne Zusatz von Salzsäure liegen lassen und schlieſslich mit ca. 2 l sterilem destillierten Wasser abgespült. Nunmehr legte ich sie mittels ausgeglühter Zange in die betreffende Bouillon.

Die Präparation des Eies in seinem natürlichen Zustande macht besonders groſse Schwierigkeiten. Um die einzelnen Bestandteile des Eies getrennt von einander zu erhalten, habe ich in den ersten Versuchen entweder mit der Öse oder Pipette Proben entnommen, oder das Ei nach der bekannten Weise zu klären gesucht, wie es in der Küche üblich ist, nachdem ich die Schale mit der Scheere durchgeschnitten hatte. Falls es nicht glückte, habe ich diese Eier aus den Tabellen ausgeschieden. Einen groſsen Nutzen brachte mir der Rat von Herrn Geheimrat Rubner, die Eier ohne Schaden für die Bakterien gefrieren zu lassen. Von da ab habe ich nur so gearbeitet und dabei viel Zeit und Material gespart. In der Mehrzahl der Fälle waren die Eier in einer Stunde in einer Kältemischung von — 15 bis — 19° C fest erstarrt und die Präparation spielend leicht. Nach 45 Minuten war das Eigelb noch ganz flüssig, oft auch das Eiweiſs, zumal bei älteren bis sog. faulen Eiern. Vielleicht in kaum der Hälfte der Fälle sprang während des Gefrierens die Schale der Eier unter einem lauten Knall nach ca. 40—50 Mi-

nuten, um so lauter, je älter die Eier waren. Die Risse betrafen nur die Schale und lagen auf einer Seite des Eies. Der Eiinhalt war dann schon fest gefroren.

Die so gefrorenen Eier habe ich mit sterilem destillierten Wasser reichlich abgespült und dann mit sterilem Messer der Länge nach bis etwa auf die Hälfte eingeschnitten. Zuvor habe ich mit einer Pinzette die Eischale in einer Rinne geöffnet, um so besser einen Stützpunkt für das Messer beim Schneiden zu haben. Dicht neben die Klinge setzte ich darauf eine starke Pinzette und konnte so mit Hilfe dieser zwei Instrumente das Ei in seiner zweiten Hälfte aufbrechen, ohne die Eimassen zu berühren. Das Ei bricht dabei genau und glatt in zwei Teile. Von diesen unberührten Flächen entnahm ich dann mit einer Lanzette die getrennten Eiproben dort, wo Eiweifs von Eischale und Eihaut einerseits, anderseits vom Eigelb getrennt ist. Das Eiweifs gefriert in leicht voneinander zu trennenden Lamellen, während das Eigelb eine feste Masse darstellt und so fest wird, dafs eine starke Platinnadel nicht einzudringen vermag. Diejenigen Eier, die ich nicht gekocht habe, wurden nach Herausnahme aus der Bouillon nochmals desinfiziert und zwar anfangs nur einige Minuten, später bis zwei Stunden lang, um zu prüfen, ob die an oder in der Schale haftenden Bakterien durch eine Sublimatlösung 1 : 1000 abgetötet werden. Die Eier wurden vorher ebenfalls mit Äther und Alkohol energisch abgewischt und das überschüssige Sublimat mit sterilem destillierten Wasser reichlich abgespült. Dagegen wurden die gekochten Eier entweder direkt in der geimpften Bouillon im Wasserbade erhitzt oder wie in der Küche in das Wasser gelegt, nachdem letzteres auf den beabsichtigten Wärmegrad vorgewärmt war.

Schliefslich bemerke ich noch, dafs ich zum Impfen der Bouillon stets 18—20 Stunden alte Agarkulturen von Laboratoriumsstämmen benutzt habe.

In Tabelle I sind diejenigen Versuche wiedergegeben, welche ich mit Bact. Coli anstellte.

Tabelle I. Bact. Coli.

Lfd. Nr.	Alter des Eies	Wieviel Tage in der Bouillon bei 37° C	Hängender Tropfen	Desinfektion	Eröffnung des Eies	Einlegen von Eischale in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eiweifs in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eigelb in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Hängender Tropfen der + Kolonien	Einwanderung der Kolikeime nach wieviel Tagen bis:
1.	frisch. Stall-ei	1	unbewegl. u bewegl. Stäbch.	—	im natürlichen Zustande	Gelatineplatt. Drygalskiplatt.	24 h + +	Gelatineplatt. Drygalskiplatt.	24 h + ·	Gelatineplatt. Drygalskiplatt.	24 h — —	unbewegl. u. bewegl. Stäbch.	nach 1 Tag bis in das Eiweifs.
2.	do.	5	do.	Äther. Alkohol 5′ Sublim. 1‰ Aq. dest.	»	Gelatineplatten Drygalski-platten	48 h + 24 h +	Gelatineplatten Drygalski-platten	48 h + 24 h +	Gelatineplatten Drygalski-platten	48 h + 24 h +	do.	nach 5 Tagen bis in das Eigelb.
3.	do.	7	do.	1 ½ h Sublim. 1‰	»	Gelatineplatten Endoplatten	+ +	Gelatineplatten Endoplatten	+ +	mifslungen		do.	nach 7 Tagen sicher bis in das Eiweifs. Eigelb sehr flüssig, von koliartigem Geruch.
4.	altes Markt-ei	10	do.	3 h Sublim. 1‰	Ei geklärt. Proben mit Pipette entnommen	Endoplatten	+	Endoplatten	+	Endoplatten	+	do.	nach 10 Tag. bis in das Eigelb.
5.	frisch. Stall-ei	1	do.	1 h Sublim. 1‰	1 h in Kältemischung von — 19° C	Endoplatten	+	Endoplatten	+	Endoplatten	—	do.	nach 1 Tag bis in das Eiweifs.
6.	do.	3	do.	—	3′ gekocht bei 100° C	Endoplatten	+	Endoplatten	—	Endoplatten	—	do.	n. 3′ Kochen Kolikeime in der Eischale
7.	do.	4	do.	—	6′ gekocht bei 100° C	Endoplatten	—	Endoplatten	—	Endoplatten	—	—	n. 6′ Kochen keine Kolikeime mehr im Ei.

Die verschiedenen Eiproben tat ich in Bouillonröhrchen und liefs diese 24—48 Stunden im Brutschrank von 37° C stehen. Diese Bouillon strich ich dann auf Platten aus und hielt letztere 1—2 Tage bei 22° C resp. 37° C. Auf allen, in der Tabelle mit + bezeichneten Platten waren typische Kolonien ausgewachsen, von denen ich je ein Agarstrichröhrchen zu den kulturellen Versuchen anlegte. Die Zuckerbouillonkölbchen waren bei 46° C im Brutschrank nach der Methode von Eijkman vergoren. Das übereinstimmende, positive Ergebnis berechtigte mich dazu, die gefundenen Keime als Bact. Coli anzusehen.

Aus dem Versuch Nr. 7 geht hervor, dafs eine Hitze von 100° C erst nach 6 Minuten imstande ist, alle Kolikeime im Ei zu vernichten, während nach 3 Minuten noch solche an der Eischale haften. Anzunehmen ist wohl, dafs im Fall Nr. 6 die Bakterien noch nicht tiefer eingedrungen sind, da sie dann auch im Innern anzutreffen sein müfsten, wenn sie nach 3 Minuten langem Kochen aus der Schale nachweisbar sind. Überdies kann ich nicht angeben, ob sie an der Aufsen- oder Innenfläche der Schale haften oder in dieser selbst sich befinden.

Ich bemerke noch, dafs die Zeit von 24 Stunden oft nicht ausreicht, die mit den Eiproben in die Bouillon gebrachten Keime zur Vermehrung und Auffindung zu bringen (cf. 2).

Aus der letzten Rubrik der Tabelle ergibt sich, dafs Bact. Coli bis in das Eigelb vorzudringen vermag, und zwar nach 24 Stunden bis in das Eiweifs und nach 5 und mehr Tagen auch bis in das Eigelb.

Durch die Untersuchungen von Piorkowski(3) im Jahre 1895 ist die Einwanderung der Typhusbazillen in das Hühnerei festgelegt. Ich habe darum auch nur einige Versuche gemacht, welche die Richtigkeit bestätigen, hauptsächlich aber den Zweck verfolgen, zu prüfen, in welcher Zeit die Bazillen im Ei durch Kochhitze vernichtet werden.

Zur Impfung der Bouillon benutzte ich einen Laboratoriumsstamm K. Zu dessen Identifizierung diente mir ein Serum (Trockenserum Merck), das in einer Verdünnung 1 : 12000 sicher

Tabelle IIa. Typhus.

Lfd. Nr.	Alter des Eies	Wieviel Tage in der Bouillon bei 37° C	Hängender Tropfen	Desinfektion	Eröffnung des Eies	Einlegen von Eischale in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eiweifs in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eigelb in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einwanderung von Typhusbazillen nach wieviel Tagen bis in:
8.	frisch. Stallei	2	sehr bewegl. Stäbchen	Äther. Alkohol 5′ Sublim. Aq. dest.	in natürlichem Zustande	Gelatineplatten Drygalskiplatt.	+ +	Gelatineplatten Drygalskiplatt	+ +	Gelatineplatten Drygalskiplatt.	— —	nach 2 Tagen bis in das Eiweifs.
9.	do.	5	do.	10′ Sublimat. etc.	do.	do. do.	+ +	do. do.	+ +	do. do.	+ +	nach 5 Tagen bis in das Eigelb.
10	do.	7	do.	1 h Sublim.	do.	do. do.	24. 48 + +	do. do.	24. 48 + +	mifslungen	—	nach 7 Tagen bis in das Eiweifs.
11.	Fleckei	10	do.	2 h Sublim.	do.	do. do.	+ +	mifslungen	—	Gelatineplatten Drygalskiplatt.	+ +	nach 10 Tagen bis in das Eigelb.
12.	frisch. Stallei	1	do.	1 h Sublim.	do	do. do.	— —	do. do.	— —	do. do.	— —	nach 1 Tag keine Typhusbazillen nachweisbar.
13.	do.	3	do.	—	3′ gekocht	do. do.	— —	do. do.	+ +	do. do.	+ +	Typhusbazillen noch nachweisbar im Eiweifs u. Eigelb.
14	do.	4	do.	—	6′ gekocht	do. do.	— —	do. do.	— —	do. do.	+ +	Typhusbazillen noch nachweisbar im Eigelb.

agglutinierte. Dasselbe Serum agglutinierte bei der orientierenden Agglutination die in der Tabelle mit + bezeichneten, abgestochenen Kolonien in einer Verdünnung 1 : 300 komplett in wenigen Sekunden.

Die mit den einzelnen Eiproben beschickten Bouillonröhrchen hielt ich 24 Stunden im Brutschrank von 37° C und strich dann 1—2 Osen auf Gelatine- und Drygalskiplatten aus. Nach 24 resp. 48 Stunden waren im Brutschrank bei 22° C und 37° C typische Kolonien ausgewachsen.

Die Versuche zeigen, dafs Typhusbazillen nach 24 Stunden die Eiwand noch nicht passiert haben, nach 2 Tagen bis in das Eiweifs und nach 3 Tagen bereits bis in das Eigelb vorgedrungen sind.

Die Kochversuche ergaben folgendes: Nach 3 Minuten langem Kochen bei 100° C fand ich Typhusbazillen im Eiweifs und Eigelb, aber nicht in der Schale (Nr. 13), während die Bact. Coli hier noch zu finden sind, und nach 6 Minuten langem Kochen noch im Eigelb. Die Typhusbazillen werden schneller durch die Hitze vernichtet als Bact. Coli. Ein mit Typhusbazillen in-

Tabelle IIb. Paratyphus B.

Lfd. Nr.	Alter des Eies	Wieviel Tage in der Bouillon bei 37° C	Hängender Tropfen	Desinfektion	Eröffnung des Eies	Einlegen von Eischale in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eiweifs in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eigelb in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einwanderung von Paratyphusbaz. nach wieviel Tagen bis in:
15.	Trinkei	1	sehr bew. Stäbchen	Äth. Alkoh. 1 h Sublim. Aq.dest.	1½ h in Kältemischg. v.—19° C	Agarplatten	+	Agarplatten	+	Agarplatten	+	nach 1 Tag bis in das Eigelb.
16.	Fleckei	3	do.	do.	1 h — 17° C	do.	+	do.	+	do.	+	nach 8 Tgn. bis in das Eigelb.
17.	do.	3	do.	do.	1 h — 14° C	do.	+	do.	+	do.	—	nach 3 Tgn. bis in das Eiweifs.
18.	do.	3	do.	—	8′ gekocht	do.	—	do.	—	do.	—	Keine Paratyphusbaz. nachweisb.
19.	do.	3	do.	—	4′ gekocht	do.	—	do.	—	do.	+	noch nachweisbar im Eigelb.

fiziertes Ei mufs mindestens 8 Minuten gekocht werden, um alle Keime zu töten.

Die Versuche habe ich in derselben Weise ausgeführt und benutzte eine 18 Stunden alte Agarkultur (Schottmüller). Zur Identifizierung bediente ich mich des Paratyphus B — Serumpapiers (Merck), das in einer Verdünnung 1 : 9800 den Stamm noch deutlich agglutinierte.

Schon nach 24 Stunden ist es mir gelungen, drei typische Kolonien auf einer Agarplatte aus dem Eigelb nachzuweisen. Sicher ist das Vordringen der Bazillen bis in das Eigelb nach 3 Tagen.

Bei den Kochversuchen wählte ich dieses Mal die Dauer von 4 und 8 Minuten. In Nr. 19 war die Mitte des Eigelbs nach 4 Minuten noch flüssig und enthielt lebende Paratyphus-B-Bazillen. In Nr. 18 war das Ei nach 8 Minuten langem Kochen vollständig hart und frei von Paratyphus-B-Bazillen.

Bei den Versuchen mit Bac. enteritidis Gärtner bediente ich mich drei verschiedener Stämme: alter Stamm, Stamm Drygalski und Stamm Ermengem. Im hängenden Tropfen erwiesen sich die Bazillen sämtlicher Stämme als nicht sehr bewegliche Stäbchen. Die Art und Weise, wie ich die Versuche anstellte, war dieselbe wie früher. Die Kulturen 18—20 Stunden alt. Es gelang mir jedoch nicht, auf den Platten typische Kolonien zu züchten. Bei Nr. 32 und Nr. 33 liefs ich die Desinfektion nach Herausnahme der Eier aus der geimpften Bouillon fort. Jetzt fand ich die Keime in der Eischale, aber nicht im Eiweifs und Eigelb. Bei zwei vorher geknickten Eiern fand ich die Bac. enteritidis G. bereits nach 24 Stunden im Eiweifs und nach 3 Tagen bereits im Eigelb. Diese beiden Versuche zeigten, dafs die Bazillen nur imstande waren, die verletzte Eiwand zu durchwandern.

Wie ich schon oben bemerkte, waren die Stäbchen aller Stämme nicht stark beweglich. Ich machte nun durch wiederholte Tierpassage dieselben virulenter, ausgenommen Stamm Er-

(Fortsetzung des Textes S. 210.)

Tabelle III. Bac. enteritidis Gaertner.

Lfd. Nr.	Bezeichnung des Stammes	Alter des Eies	Wieviel Tage in der Bouillon bei 37° C	Hängender Tropfen	Desinfektion	Eröffnung des Eies	Einlegen von Eischalen in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eiweifs in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eigelb in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einwanderung der Bac. enteritidis G. nach wieviel Tagen bis in:
20.	alter Stamm	Markt-ei	22 Std.	schw. bewegl. Stäbchen	Äther. Alkohol 1 h Subl. Aq. dest.	40′ — 17° C	Agarplatten	—	Agarplatten	—	Agarplatten	—	keine.
21.	do.	Trink-ei	3	do.	do.	45′ — 19° C	„	—	„	—	„	—	„
22.	do.	do.	3	do.	do.	1 h — 14° C	„	—	„	—	„	—	„
23.	do.	do.	3	do.	—	8′ gekocht	„	—	„	—	„	—	„
24.	do.	do.	5	do.	—	4′ gekocht	„	—	„	—	„	—	„
25.	do.	do.	9	do.	1 h Sublim.	45′ — 15° C	„	—	„	—	„	—	„
26.	Stamm Drygalski	Fleck-ei	1	do.	do.	1 h — 17° C	„	—	„	—	„	—	„
27.	do.	do.	6	do.	do.	1 h — 15° C	„	—	„	—	„	—	„
28.	do.	do.	6	do.	—	4′ gekocht	„	—	„	—	„	—	„
29.	alter Stamm	Knick-ei	1	do.	1 h Sublim.	1 h — 15° C	„	+	„	+	„	—	nach 1 Tag bis i. das Eiweifs.
30.	do.	do.	3	do.	do.	do.	„	+	„	+	„	+	nach 3 Tagen bis i. das Eigelb.
31.	do.	Markt-ei	3	do.	—	$\frac{1}{2}$ h auf 80° C erhitzt	„	—	„	—	„	—	keine.
32.	do.	do.	3	do.	—	1 h — 17° C	„	+	„	—	„	—	nach 3 Tagen bis in die Eischale.
33.	Stamm Drygalski	do.	5	do.	—	$1\frac{1}{4}$ h — 19° C	„	+	„	—	„	—	nach 5 Tagen bis in die Eischale
34.	Stamm Ermengem	do.	2	do.	1 h Sublim.	1 h — 15° C	„	—	„	—	„	—	keine.
35.	do.	do.	2	do.	—	$\frac{1}{2}$ h auf 80° C erhitzt	„	—	„	—	„	—	„

(Fortsetzung der Tabelle III.)

Lfd. Nr.	Bezeichnung des Stammes	Alter des Eies	Wieviel Tage in der Bouillon bei 37° C	Hängender Tropfen	Desinfektion	Eröffnung des Eies	Einlegen von Eischale in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eiweifs in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einlegen von Eigelb in Bouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 37° C	Wachstum auf den Platten	Einwanderung der Bac. enteritidis G. nach wieviel Tagen bis in
36.	virulent gemacht. Stamm Drygalski	Markt-ei	2	stark bewegl. Stäbchen	1 h Sublim.	1 h −16° C	Agarplatten	+	Agarplatten	+	Agarplatten	—	nach 2 Tagen bis in das Eiweifs.
37.	do.	do.	2	do.	—	1 h auf 80° C erhitzt	"	—	"	—	"	—	Toxinbildung im Eigelb.
38.	virulent gemacht. alter Stamm	do.	2	do.	—	1 h −15° C	"	+	"	+	"	+	nach 2 Tagen bis in das Eigelb
39.	virulent gemacht. Stamm Drygalski	do.	2	do.	1½ h Sublim.	do.	"	+	"	+	"	+	do.
40.	Stamm Ermengem	do.	7	schw bewegl. Stäbchen	do.	do.	"	—	"	—	"	—	keine.
41.	do.	do.	9	do.	—	1 h auf 60° C erhitzt	"	—	"	—	"	—	"
42.	virulent gemacht. alter Stamm	do.	4	stark bewegl. Stäbchen	1 h Sublim.	1 h −15° C	"	+	"	+	"	—	nach 4 Tagen bis in das Eiweifs.
43.	virulent gemacht. Stamm Drygalski	do.	7	do.	—	1 h auf 70° C erhitzt	"	—	"	—	"	—	Toxinbildg.

mengem. Jetzt konnte ich schon nach 2 Tagen im Eigelb die Bac. enteritidis G. alter Stamm und Stamm Drygalski durch die kulturellen Versuche und durch das Tierexperiment nachweisen. Zur Kontrolle liefs ich nochmals ein Ei 7 Tage lang in mit Stamm Ermengem geimpfter Bouillon liegen und fand wieder keine Bazillen. Mit der Virulenz hatte auch die Beweglichkeit der Stäbchen bedeutend zugenommen. Es scheint, dafs

dieses Moment die Differenz des Resultates mit Bac. enteritidis G. bedingt hat.

Bei den Kochversuchen kann ich aus demselben Grunde nur die Versuche Nr. 37 und Nr. 43 heranziehen, nicht diejenigen, welche ich mit den Kulturen vor der Virulenzsteigerung gemacht habe. Ebenso Nr. 41, Stamm Ermengem. In einem Ei, das $^1/_2$ Stunde auf 80° C oder 1 Stunde auf 70° C erhitzt wird, sind keine Bac. enteritidis G. zu finden. Bemerkenswert sind die Nr. 37, Nr. 41 und Nr. 43 dadurch, dafs einmal auf den Platten trotz der halbstündigen Erwärmung auf 80° C noch Kokken auswachsen, und dafs das Eiweifs eines Eies, auf 60° C 1 Stunde lang erwärmt, noch völlig flüssig wie rohes Eiweifs, nur milchig getrübt ist. Das Eigelb ist auch dünnflüssig. Bei einer einstündigen Erwärmung auf 70° C ist das Eiweifs leicht geronnen, aber immerhin noch zerfliefslich, während das Eigelb zur festen Kugel erstarrt ist. Demnach gerinnt das Eigelb leichter als das Eiweifs.

Zur Identifizierung der im Eiweifs und Eigelb gefundenen Keime habe ich mich auf die kulturellen und Tierversuche beschränken müssen. Ein Gaertner-Serum stand mir nicht zur Verfügung. Bei den Infektions- sowie Intoxikationsversuchen erkrankten sämtliche Mäuse mehr oder weniger schwer. Diejenigen Mäuse, welchen entweder Bouillon, die Eiproben nach gesteigerter Virulenz der Stämme enthielt, subkutan oder intraperitoneal eingespritzt wurde, oder welche Teile von solchen gekochten Eiern frafsen, erkrankten schneller und starben nach einigen Stunden bis Tagen. Dagegen erholten sich die Mäuse nach längerer Zeit, welche mit den Eiern vor der Virulenzsteigerung behandelt waren. Bei den kranken Tieren fiel besonders deutlich die Lähmung der hinteren Extremitäten auf, die ich oft in jede beliebige Lage bringen konnte, und bei den verfütterten Mäusen war das Fell um den After herum mit dünnflüssigen, gelben Eimassen beschmutzt. Die Sektion der gestorbenen Mäuse ergab jedesmal Reizzustände im Verdauungskanal, Schwellung der Milz, Hyperämie der inneren Organe und flüssiges Blut in den Herzhöhlen. Auf allen Platten, die ich

mit dem Milz- und Herzblut der infizierten Mäuse geimpft hatte, wuchsen wieder typische Kolonien mit sehr beweglichen Stäbchen aus, während die Platten, welche ich mit dem der vergifteten Mäuse bestrichen hatte, steril blieben.

Eine einstündige Erhitzung auf 80° C der ganzen Eier oder der mit den Eiproben beschickten Bouillon änderte an der Wirkung nichts. Bemerken möchte ich noch, dafs in den Fällen, in welchen es mir nicht gelang, die Bac. enteritidis G. in den Eiern nachzuweisen, die Mäuse in einer Zeit bis 30 Stunden starben. Demnach müfsten sich im Eiinnern nach Vernichtung der Bazillen Gifte bilden oder solche von aufsen her, aus der geimpften Bouillon, in das Ei durch die Schale hindurch gelangen.

Tabelle IV. Botulinus.

Lfd. Nr.	Alter des Eies	Wieviel Tage in der Zuckerbouillon bei 22° C	Hängender Tropfen	Desinfektion	Eröffnung des Eies	Einlegen von Eischale in Zuckerbouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 22° C	Zuckeragarröhrchen (Wachstum)	Einlegen von Eiweifs in Zuckerbouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 22° C	Zuckeragarröhrchen (Wachstum)	Einlegen von Eigelb in Zuckerbouillon. Davon nach 24 h im Brutschrank von 22° C	Zuckeragarröhrchen (Wachstum)	Einwanderung von Bac. botulinus nach wieviel Tagen bis
44.	Trinkei	6	bewegl Stäbchen	—	4′ gekocht	Gelatineplatten	—	Gelatineplatten	—	Gelatineplatten	—	Toxinbildg.
45.	do.	4	do.	Äther. Alkohol 1 h Sublim. Aq.dest.	1 h −19° C	»	+	»	+	»	—	nach 4 Tagen bis in das Eiweifs.
46.	Marktei	4	do.	—	½ h 80° C	»	—	»	—	»	—	—
47.	do.	9	do.	1 h Sublim.	1 h −17° C	»	+	»	+	»	—	nach 9 Tagen bis in das Eiweifs.
48.	do.	9	do.	do.	do.	»	+	»	+	»	+	nach 19 Tagen bis in das Eigelb.

Den Laboratoriumsstamm habe ich im hohen Zuckerröhrchen 48 Stunden im Brutschrank bei 37° C wachsen lassen. Mit diesen Kulturen habe ich Zuckerbouillon reichlich geimpft und

in dieser die desinfizierten Eier anaërob im Brutschrank von 22° C gehalten. Nach 4 Tagen fand ich die Bazillen im Eiweifs und nach 9 Tagen auch im Eigelb.

Mäuse, denen ich solche Eimassen in rohem Zustande auf Brotstückchen zu fressen gab, erkrankten in wenigen Stunden. Auch hier trat die Lähmung der Hinterbeine am deutlichsten hervor. Dieselben erholten sich nach mehreren Tagen wieder, wurden munter und nahmen Nahrung zu sich. Andere Tiere, denen ich eine Öse einer aus den Eiern gewonnenen Zuckeragarkultur in Bouillon intraperitoneal oder subkutan einspritzte, starben fast durchweg am zweiten Tage. Noch schneller trat der Tod ein, wenn ich die mit den Eiproben beschickte Zuckerbouillon erst mehrere Tage im Brutschrank von 26° C stehen liefs und dann die Mäuse damit impfte. Nach Einverleibung des keimfreien Filtrats erkrankten die Mäuse und wurden wieder gesund. Dagegen blieben alle Mäuse gesund, denen ich entweder Bouillon von vorher gekochten Eiern oder das während ½ Stunde auf 80° C erhitzte keimfreie Filtrat einspritzte.

Um schliefslich dem Einwande zu begegnen, es möchten sich im Ei auch unter natürlichen Verhältnissen Gifte bilden, die den Tod einer Maus verursachen könnten, oder die subkutane oder intraperitoneale Einverleibung eines ganzen Kubikzentimeters Bouillon dürfte schon an und für sich eine Maus töten, habe ich eine ganze Reihe von Kontrollversuchen gemacht, aus denen sämtliche Mäuse unbeschadet ihrer Gesundheit hervorgegangen sind. Zu diesem Zwecke habe ich Proben von ebenso desinfizierten und gefrorenen Eiern sofort in Bouillon getan, diese mehrere Tage bei 37° C im Brutschrank stehen lassen und davon verschiedenen Mäusen je 1 ccm intraperitoneal und subkutan eingespritzt. Dasselbe habe ich mit anderen Mäusen getan, nachdem ich die desinfizierten Eier entweder trocken in sterilen Gläsern oder in steriler Bouillon mehrere Tage ebenfalls im Brutschrank von 37° C hatte liegen lassen. Die Atmung der Tiere war zwar für die ersten Stunden etwas beschleunigt. Sonst blieben sie munter und frafsen. Keine von ihnen starb.

Daraus folgt, daſs unter den angewandten Versuchsbedingungen das Hühnerei in seinem natürlichen Zustande keine Stoffe enthält, die den Tod einer Maus verursachen.

Zum Schluſs fasse ich meine gewonnenen Resultate kurz zusammen:

1. Koli-, Typhus-, Paratyphus-B-, Gaertner- und Botulinusbazillen besaſsen in den vorliegenden Versuchen sämtlich die Fähigkeit, die intakte Eiwand eines Hühnereies zu durchwandern und bis in das Eigelb vorzudringen.
2. Die Kochhitze von 100° C vermag dieselben auſser Bac. botulinus erst nach 8 Minuten im Eigelb zu töten, während eine halbstündige Erwärmung auf 80° C oder eine einstündige auf 70° C die genannten Keime noch nicht vernichtet.
3. Bei Eiern, die in mit Bac. enteritidis Gaertner und botulinus geimpfter Bouillon gelegen hatten, waren Gifte im Eigelb vorhanden, ohne daſs der Nachweis lebender Bazillen gelang.
4. Die Fähigkeit der Bazillen, die Eiwand des Hühnereies zu durchwandern, scheint von der Intensität der Eigenbewegung abhängig zu sein.
5. Das Hühnereiweiſs, eine Stunde auf 60° C erwärmt, ist flüssig wie rohes Eiweiſs, nur milchig getrübt. Das Eigelb ist auch noch flüssig. Eine Stunde auf 70° C erwärmt, ist das Eiweiſs leicht geronnen, aber noch zerflieſslich, das Eigelb dagegen fest erstarrt.

Den Herren Geheimrat Rubner und Prof. Ficker spreche ich für die Anregung und das ständige Interesse meinen ergebensten Dank aus.

Literatur.

1. K. Borchmann, Denkschrift betr. die amtliche Kontrolle des Marktverkehrs mit Eiern. Berlin 1906.
2. Sachs-Müke. Arbeit erscheint in diesem Archiv.
3. Piorkowski, Arch. f. Hyg., 1895, XXV.

Die Wärmetönung bei der fermentativen Spaltung der Eiweifskörper und des Leims.

Von

Dr. E. Grafe,

ehemaligem Assistenten des Institutes.

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. M. Rubner.)

Auf die grofse Bedeutung der Wärmetönung für das Verständnis der biologischen Fermentreaktionen hat vor einigen Jahren R. O. Herzog in einer sehr interessanten Studie[1]) hingewiesen. Die Tatsache, dafs in den letzten Jahren eine Reihe von synthetisierenden Fermenten entdeckt wurde, bei deren Wirkung Wärme gebunden wird, zwingt zu der Annahme eines chemischen Gleichgewichts bei Fermentwirkungen. A priori läfst sich bei solchen Gleichgewichtszuständen nur ihre Beziehung zu der Temperatur bestimmen. Denn hier galten die beiden von van 't Hoff aufgestellten Sätze:

1. Ist bei einer chemischen Reaktion die Wärmeentwicklung = 0, so tritt auch mit Veränderung der Temperatur keine Verschiebung des Gleichgewichts ein. Dieser Fall ist streng nur verwirklicht beim Gleichgewicht von entgegengesetzt optisch aktiven Körpern.

---

[1]) R. O. Herzog, Fermentreaktion und Wärmetönung, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 37, S. 383.

[2]) van 't Hoff, Vorlesungen I, S. 157, 1898.

2. Steigende Temperatur begünstigt das unter Wärmeabsorption gebildete System.

Wenn man diese Sätze auf die fermentativen Vorgänge im tierischen Körper anwendet, der stets das Bestreben hat, innerhalb ganz geringer Schwankungen seine Temperatur auf gleicher Höhe zu halten, so ergibt sich dabei für die exothermischen Prozesse eine Begünstigung, während in diesem Falle das Gleichgewicht zu Ungunsten der entgegengesetzt verlaufenden Reaktion verschoben wird; für die endothermischen, d. h. mit einer Wärmebindung einhergehenden Vorgänge gilt genau das Gegenteil. Da im Organismus Abbau und Aufbau unter Benutzung derselben Bausteine vor sich gehen — ich denke hier in erster Linie an die Eiweifskörper —, so ist es von grofsem Interesse zu erfahren, ob es sich im ersten Falle um einen exothermischen, im zweiten um einen endothermischen Vorgang handelt.

Während sich nun die Wärmetönung für eine Reihe von Fermentreaktionen ohne Schwierigkeit berechnen läfst, da der Energiegehalt der Spaltungsprodukte bekannt ist oder sich unschwer feststellen läfst, ist es bisher nicht möglich gewesen, etwas Sicheres über die Wärmetönung bei der Spaltung der Eiweifskörper zu erfahren, denn es ist bisher noch nicht gelungen, sämtliche Spaltungsprodukte eines Eiweifskörpers quantitativ zu fassen und die Verbrennungswärmen im Einzelnen zu bestimmen.

Nach den bisher in der Literatur vorliegenden Tatsachen, die eventuell Schlüsse zu ziehen gestatten, würde man bei der Spaltung der Eiweifskörper eine ganz geringe Wärmetönung zu erwarten haben.[1])

Auf Grund der vielen Arbeiten von E. Fischer und seinen Schülern aus den letzten Jahren mufs man annehmen, dafs im Eiweifsmolekül die Verknüpfung jedenfalls sehr vieler Bausteine durch die NH-Gruppe geschieht, wie es einige Jahre früher schon Kossel[2]) für möglich gehalten hatte.

---

[1]) van 'tHoff, 8 Vorträge, S. 58, 1902 und E. Fischer und F. Wrede, Sitzungsberichte der Kgl. preufs. Akad. d. Wissensch. Berlin 1904, 687—715.

[2]) Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXV, S. 189, 1898.

Da es aber zur Zeit noch ganz unbekannt ist, ob die Imidgruppen die einzigen im Eiweifsmoleküle vorkommenden Bindeglieder darstellen, ist der Wert einer solchen Prophezeihung gering.

Eine Antwort auf die vorliegende wichtige Frage kann meiner Meinung nach vorläufig nur durch eine direkte fortlaufende Messung der bei der künstlichen, enzymatischen Verdauung auftretenden Temperaturschwankungen, falls überhaupt solche auftreten, gegeben werden. Da man auf nur sehr geringe Wärmemengen gefafst sein mufs, kann nur ein sehr empfindliches Instrument hier zur Anwendung kommen. Ein solches besitzen wir aber erst seit den Untersuchungen von Rubner[1]) über die bei der Häfegärung frei werdenden Wärmemengen. Zu ihrer Messung konstruierte er ein ebenso einfaches wie fein arbeitendes Kalorimeter. Dies besteht aus einem etwa 300 ccm fassenden Glaskolben, dessen Innenraum von zwei $^1/_2$ cm von einander entfernten Glashüllen umgeben ist. Die dazwischen befindlichen Räume sind völlig luftleer gepumpt und verhindern so einen Wärmeverlust des Instrumentes durch Leitung. Je drei solcher Gefäfse — eines dient zur Kontrolle der Brutschranktemperatur, die beiden anderen zur Aufnahme der zu untersuchenden Substanzen — werden, durch Schirme von einander getrennt, in einen gut regulierten Brutschrank aufgestellt, und durch feine Thermometer, die durch den Hals der Instrumente in die Innenflüssigkeit eintauchen, werden mit der Lupe die Temperaturschwankungen abgelesen. Bezüglich aller Details der Handhabung und der Berechnung verweise ich auf die beiden zitierten Arbeiten Rubners.

Mit diesem überraschend einfachen Apparate, dessen exakte Handhabung allerdings einige Übung erfordert, gelang es Rubner, für die bei der Inversion des Rohrzuckers frei werdende minimale Wärmemenge einen deutlich mefsbaren Ausschlag zu erhalten und daraus die Inversionswärme zu berechnen. Aus der Differenz der Verbrennungswärmen von Rohrzucker und

---

[1]) Archiv f. Hygiene. Bd. 48, S. 260 und Bd. 49, S. 355, 1904.

Traubenzucker hat Strohmann dafür die Zahl 3,1 kleine Kalorien pro 1 Molekül Invertzucker gefunden, Rubners Wert ist 3,29, stimmt also sehr nahe damit überein. Was die Empfindlichkeit der Kalorimeter betrifft, so wird die stündliche Wärmeentwicklung von 1,7 kleinen Kalorien durch Temperatursteigerung von 0,02° angezeigt; durch Versilberung der Kalorimeter, wie Rubner sie neuerdings anbringen läfst, wird man noch weiter von der Umgebungstemperatur unabhängig und vermag den Wärmeverlust so einzuschränken, dafs die Empfindlichkeit noch etwa zehnfach gröfser ist.

Da also hier noch 0,17 kleine Kalorien mefsbar sind, durfte man es wagen, mit diesen Instumenten an die Beantwortung der Frage nach der Wärmetönung bei der Eiweifsverdauung heranzugehen. Für den Fall einer deutlich positiven Wärmeabgabe hätte man hier noch den grofsen Vorteil, eventuell durch die Kurve Einblicke in die einzelnen Stadien der Eiweifsverdauung zu bekommen, da die verschiedenen Lösungsverhältnisse der Aminosäuren eventuell in irgend einer Weise in der Kurve sich ausprägen könnten. Grofs war allerdings die Wahrscheinlichkeit nicht, denn ich mufste von vornherein auf das Auftreten von nur geringer oder vielleicht gar keiner Wärmebewegung gefafst sein.

Als die Vorversuche bereits im Gange waren, erschienen dann die Arbeiten aus Tangls Institut.[1]) Sie suchten von einer anderen Seite her die Lösung der Frage nach der Wärmestörung in Angriff zu nehmen, und zwar mit Hilfe vergleichender kalorimetrischer Bestimmungen am Anfang und am Ende der Verdauung. Die Methodik war schon vorher zur Bestimmung der Entwicklungsarbeit im Vogelei, Fischei und in Bakterienkulturen von Tangl[2]) ausgearbeitet worden und hatte dort, wenigstens bei den beiden ersten Objekten, gute Dienste geleistet. Sie besteht

[1]) Untersuchungen über die Wärmetönung von Enzymreaktionen. 3 Mitteilungen von Tangl, von Lengyel und Hari. Pflügers Archiv. Bd. 115, S. 1—52.

[2]) Pflügers Archiv. Bd. 93, S. 327; Bd. 98, S. 475 und 490; Bd. 104 S. 624.

darin, dafs der Energiegehalt eines Verdauungsgemisches durch Verbrennen der Trockensubstanz zu Anfang und nach beliebig lange fortgesetzter Verdauung vermittelst der Berthelot-Mahlerschen Bombe festgestellt wurde. Die Differenz der gefundenen Werte zeigt dann, ob während der Verdauung chemische Energie verloren gegangen ist oder nicht, d. h. ob die Enzymreaktion mit positiver oder negativer Wärmetönung einhergeht. Bevor ich auf die Bedenken eingehe, die der Anwendung der Methode auf die hier in Frage stehenden Prozesse entgegenstehen, möchte ich kurz die Resultate erwähnen, die damit erzielt wurden. v. Lengyel konnte während einer 10tägigen Verdauungsperiode von Merckschem Ovalbumin durch Pepsin (Merck) keine Energieabnahme feststellen. Die minimalen Differenzen, die sich in einzelnen Fällen fanden, liegen völlig im Bereich der Versuchsfehler.

Hari, der die Wärmetönung der Trypsinverdauung des Eiweifses studierte, fand in allen Fällen eine Abnahme des Energiegehaltes nach der Verdauung, aber in einer besonders in der dritten Versuchsreihe regellosen Weise. Dies fällt nicht nur bei der Betrachtung der Werte der einzelnen Reihen auf, sondern vor allem auch beim Vergleich der Zahlen ein und derselben Reihe miteinander. Obwohl die Ausgangsmaterialien nicht sehr verschieden waren, erhielt Hari, um nur ein Beispiel herauszugreifen, in einem Falle nach 42tägiger Verdauung einen Energieverlust von 3,99 %, im zweiten Falle nach 45 Tagen einen solchen von 2,36 %, im dritten Falle nach 51 Tagen einen von 0,96 %. Auch die Parallelversuche stimmen meist sehr wenig miteinander überein. So fand Hari in seiner dritten Versuchsreihe nach 4 Tagen 0,10 % Energieverlust, im genau gleichen Parallelversuch dagegen 1,57 %. Diese Regellosigkeit ist, wie Hari meint, nicht so sehr von ausschlaggebender Bedeutung für die Frage nach dem Energieverbrauch während der Verdauung, sondern dürfte in erster Linie dem Versagen der angewandten Methodik beizumessen sein. Die Fehlerquellen verkennt Hari selbst keineswegs und sucht sie nach Möglichkeit auszuschalten, aber sie sind so grofs und vor allem so unkontrollierbar, dafs die damit behafteten Zahlen dadurch sehr unsicher werden. Die Hauptfehler-

quelle ist der unvermeidliche Substanz- und Energieverlust während des zur Verbrennung mit der Bombe notwendigen Eindampfens der Verdauungsflüssigkeiten.

Die Menge Substanz, die gasförmig während des Eindampfens entweicht, läfst sich zur Not noch feststellen, von der Gröfse des dadurch bedingten Energieverlustes kann man sich jedoch in keiner Weise eine irgendwie genaue Vorstellung machen. Ein zweiter Einwand ist der, dafs die Versuche gar nicht unter physiologischen Verhältnissen angestellt worden sind, da die Reaktion der Verdauungsgemische entweder neutral oder schwach sauer war, während doch der Pankreassaft in alkalischer Lösung das Optimum seiner Wirksamkeit hat. Gleichwohl geht aus der dauernden Abnahme der koagulierbaren N-Substanz hervor, dafs die Spaltung der Eiweifskörper einigermafsen kräftig vor sich ging.

Meiner Überzeugung nach haben von allen gefundenen Zahlen nur die einen Wert, die eine geringe Differenz des Energieinhaltes zwischen dem verdauten und dem unverdauten Gemisch ergeben haben, da offenbar in diesen Fällen beim Eindampfen wenig Substanz und Energie verloren ging. Danach müfste man also annehmen, dafs während einer 51 tägigen Verdauungsperiode der Energiegehalt des Verdauungsgemisches nur um 0,96 % abnähme. Irgendeine Genauigkeit kann dieser Zahl nicht zukommen, sie ist jedenfalls eher zu niedrig als zu hoch und deutet darauf hin, dafs der Energieverlust während der Verdauung entweder sehr gering oder gar nicht vorhanden ist. Diesen Schlufs zieht auch Hari aus seinen Resultaten. Zur Entscheidung der Frage ist der hier eingeschlagene Weg ungeeignet.

Ich gehe nun zur Mitteilung der eigenen, mit der oben beschriebenen, kalorimetrischen Methode gewonnenen Resultate über.

Die ersten Versuche mufsten mit den etwas weniger empfindlichen, nicht versilberten Kalorimetern gemacht werden, da hier die Trägheit des Instrumentes viel geringer ist und daher vor allem auch die Einstellung bei sinkender Temperatur viel schneller erfolgt. Erst als mit den gewöhnlichen Kalorimetern kein Ausschlag erhalten wurde, konnte ich darangehen, die Frage nach

der Wärmetönung mit den versilberten Instrumenten endgültig zu entscheiden.

Pepsinverdauung.

Nr. I. Versuch mit unversilberten Kalorimetern.

Versuch Nr. 16. Füllung von Kalorimeter Nr. 1 mit 20 g chemisch-reinem Kasein (Höchst) + 10 ccm Magensaft + 10 ccm Toluol + 290 ccm 0,35 proz. Salzsäure. Kalorimeter Nr. 2 diente zur Kontrolle der Temperatur des Brutschrankes und war mit 300 ccm 1 prom. Sublimatlösung gefüllt. Kalorimeter Nr. 3 wurde in gleicher Weise beschickt wie Nr. 1 und diente als Parallelversuch zu Nr. 1.

Die Füllung der Kalorimeter geschah erst, als die Temperatur der drei Kalorimeter bis auf $^1/_{100}{}^0$ dieselbe war.

Beginn des Versuchs (Einfüllen der Flüssigkeiten in Nr. I und Nr. III) um $^1/_2$1 Uhr, am 11. III. 07.

Die Thermometerablesungen waren die folgenden:

Datum	Stunde	Temperatur in Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2	Temperatur in Nr. 2	Differenzen von Nr. 2	Temperatur in Nr. 3	Differenzen mit Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2
11. III. 07	3	38,33	+ 0,03	38,30	0,07	38,33	0,00	+ 0,03
	9	38,38	+ 0,01	38,37		38,35	— 0,03	— 0,02
12. III.	9	38,51	+ 0,01	38,50	0,13	38,50	— 0,01	0,00
	5	38,54	— 0,01	38,55	0,05	38,535	— 0,005	+ 0,015
13. III.	9	38,53	— 0,01	38,54	0,01	38,545	+ 0,015	+ 0,005
	1	38,52	— 0,02	38,54	0,00	38,53	+ 0,01	+ 0,01
	6	38,52	— 0,01	38,53	0,01	38,53	+ 0,01	0,00
14. III.	9	38,365	— 0,005	38,37	0,16	38,38	+ 0,015	+ 0,01
	5	38,38	— 0,02	38,40	0,03	38,38	0,00	+ 0,02
15. III.	10	38,41	— 0,01	38,42	0,02	38,42	+ 0,01	0,00
16. III.	10	38,46	— 0,01	38,47	0,05	38,48	+ 0,02	+ 0,01
17. III.	10	38,46	— 0,01	38,47	0,00	38,48	+ 0,02	+ 0,01
18. III.	10	38,48	— 0,04	38,52	0,05	38,52	+ 0,04	0,00
19. III.	10	38,31	— 0,03	38,34	0,18	38,32	+ 0,01	— 0,02
20. III.	10	38,43	— 0,01	38,44	0,10	38,46	+ 0,03	+ 0,02[1])

[1]) Abbruch des Versuches.

Nr. II. Versuch mit Silberkalorimetern.

Versuch Nr. 24. Kalorimeter Nr. 1 wurde mit 30 g gut ausgewaschenem, zwischen Fliefspapier getrocknetem Fibrin + 1 g Pepsin (Grübler) + 10 ccm Toluol + 290 ccm 0,35 proz. Salzsäurelösung gefüllt. Kalorimeter Nr. 2 diente wieder als Kontrolle für die Temperatur, Kalorimeter Nr. 3 wurde mit gleicher Füllung wie Nr. 1. zum Parallelversuch benutzt. Um bei der Trägheit der Instrumente möglichst gleiche Temperaturen zu Beginn des eigentlichen Versuchs zu bekommen und die durch die Quellung etwa auftretenden Wärmebewegungen auszuschliefsen, wurde das Ferment erst etwa 24 Stunden später, als die Temperaturen in den Kalorimetern 38,31°, 38,30° und 38,29° betrugen, zugegeben, und zwar am 25. V. 07, um 11 Uhr.

Die Thermometerablesungen waren folgende:

Datum	Stunde	Temperatur in Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2	Temperatur in Nr. 2	Differenzen von Nr. 2	Temperatur in Nr. 3	Differenzen mit Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2
25. V.	12½	38,25	— 0,03	38,28	0,06	38,23	— 0,02	— 0,05
	9	38,33	— 0,01	38,34		38,31	— 0,02	— 0,03
26. V.	9½	38,43	— 0,01	38,44	0,10	38,42	— 0,01	— 0,02
	6½	38,46	± 0,00	38,46	0,02	38,44	— 0,02	— 0,02
27. V.	10	38,47	— 0,04	38,51	0,05	38,49	+ 0,02	— 0,02[1]

Bei Beendigung des Versuches war noch nicht alles Fibrin in Lösung gegangen.

Trypsinverdauung.

Nr. III. Versuche mit unversilbertem Kalorimeter.

Nr. 5. Verdauung von Gelatine. Kalorimeter Nr. 1 wurde mit 30 g gelöster Gelatine + 20 ccm frischem Pankreassaft[2]) + 10 ccm Toluol + 270 ccm 0,8 proz. Sodalösung gefüllt. Kalorimeter Nr. 2 diente wieder zur Kontrolle, Kalorimeter Nr. 3 zum Parallelversuch. Beginn des Versuchs am 18. November 1906, um 12 Uhr.

[1]) Abbruch des Versuches.

[2]) Den frischen Pankreassaft sowie den Magensaft verdanke ich der grofsen Liebenswürdigkeit von Herrn Dr. Abderhalden am I. Chemischen Institut.

Datum	Stunde	Temperatur in Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2	Temperatur in Nr. 2	Differenzen von Nr. 2	Temperatur in Nr. 3	Differenzen mit Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2
18. XI.	4	37,91	+ 0,05	37,86	0,08	37,935	+ 0,025	+ 0,075
	9	37,95	+ 0,01	37,94		37,955	+ 0,005	+ 0,01
19. XI.	9	38,015	+ 0,015	38,00	0,06	38,015	0,00	+ 0,015
	1	38,015	+ 0,015	38,00	0,00	38,01	— 0,005	+ 0,01
	5	38,015	— 0,005	38,02	0,02	38,015	0,00	— 0,005
20. XI.	10	37,855	0,00	37,855	0,165	37,82	— 0,035	— 0,035
	1	37,78	0,00	37,78	0,075	37,77	— 0,01	— 0,01
	6	37,78	0,00	37,78	0,00	37,77	— 0,01	— 0,01
21. XI.	10	37,735	+ 0,005	37,73	0.05	37,72	— 0,015	— 0,01
	1	37,715	+ 0,005	37,71	0,02	37,69	— 0,025	— 0,02
	7	37,75	+ 0,01	37,76	0,05	37,75	0,00	— 0,01
22. XI.	10	37,78	0,00	37,78	0,02	37,775	— 0,005	— 0,005
	5	37,80	— 0,01	37,81	0,03	37,79	— 0,01	— 0,02
23. XI.	10	37,83	+ 0,01	37,82	0,01	37,82	— 0,01	0,00
	1	37,85	— 0,005	37,855	0,035	37,85	0,00	— 0,005
25. XI.	10	38,02	0,00	38,02	0,165	38,025	+ 0,005	+ 0,005
	7	38,13	— 0 01	38,14	0,12	38,135	+ 0,005	— 0,005
26. XI.	10	38,225	— 0,005	38,23	0,09	38,225	0,00	— 0,005
	7	38,29	— 0,02	38,31	0,08	38.305	+ 0,015	— 0,005
27. XI.	10	38,31	— 0,015	38,325	0,015	38,315	+ 0,005	— 0,01
	7	38,33	— 0,005	38,335	0,01	38,33	0,00	— 0,005[1]

Nr. 14. Versuch mit Kasein. Kalorimeter Nr. 1 wurde mit 30 g Kasein (Höchst) + 10 ccm Toluol + 20 ccm Pankreassaft + 270 ccm 0,8 proz. Sodalösung gefüllt. Nr. 2 war Kontrolle, Nr. 3 diente zum Parallelversuch.

Beginn des Versuchs am 12. Februar 1907, $10^1/_2$ Uhr.

Die Temperaturen in der Folgezeit waren:

Datum	Stunde	Temperatur in Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2	Temperatur in Nr. 2	Differenzen von Nr. 2	Temperatur in Nr. 3	Differenzen mit Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2
12. II.	3	38,27	— 0,02	38,29	0,01	38,275	+ 0,005	— 0,015
	8	38,26	— 0,02	38,28		38,27	— 0,01	— 0,01
13. II.	$9^1/_2$	38,155	— 0,005	38,16	0,12	38,135	— 0,02	— 0,025
	$12^1/_2$	38,125	— 0,025	38,15	0,01	38,15	0,025	0,00
	7	38,18	0,00	38,18	0,03	38,175	— 0,005	— 0,005
14. II.	$9^1/_2$	38,135	— 0,015	38,15	0,03	38,14	+ 0,005	— 0,01
15. II.	$9^1/_2$	38,15	— 0,005	38,155	0,005	38,15	0,00	— 0,005

[1]) Abbruch des Versuchs.

Der Versuch wurde noch 2 Wochen weiter fortgeführt, ohne dafs sich nennenswerte Differenzen zwischen den Temperaturen fanden. Bei Beendigung war die ganze Flüssigkeit klar, in dem Sediment befanden sich Tyrosin und Leucin in gröfserer Menge.

Nr. IV. Versuche mit Silberkalorimeter.

Nr. 25. Füllung von Kalorimeter Nr. 1 mit 30 g Fibrin + 1 g Trypsin (Grübler) + 10 ccm Toluol + 290 ccm 0,8 proz. Sodalösung. Kalorimeter Nr. 2 diente wieder zur Kontrolle, Kalorimeter Nr. 3 als Parallelversuch. Um bei der Trägheit der Silberkalorimeter möglichst gleiche Temperaturen zu erhalten, wurden die Gemische ohne Fermente 24 Stunden in den Kalorimetern stehen gelassen. Am 28. V. 07, 11½ Uhr, als die Temperaturen der drei Kalorimeter 38,35°, 38,44°, 38,41° betrugen, wurde die auf gleiche Temperatur gebrachte Lösung des Fermentes in 10 ccm 0,8 proz. Sodalösung hinzugegeben.

Es wurden dann die folgenden Temperaturen abgelesen:

Datum	Stunde	Temperatur in Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2	Temperatur in Nr. 2	Differenzen von Nr. 2	Temperatur in Nr. 3	Differenzen mit Nr. 1	Differenzen mit Nr. 2
28. V.	12	38,46	+ 0,05	38,41		38,38	— 0,08	— 0,03
	4	38,46	+ 0,04	38,42	0,01	38,39	— 0,07	— 0,03
	11	38,44	+ 0,03	38,41	0,01	38,38	— 0,06	— 0,03
29. V.	8	38,31	+ 0,03	38,28	0,13	38,28	— 0,03	0,00
	11	38,31	+ 0,04	38,27	0,01	38,27	— 0,04	0,00
	7	38,30	+ 0,02	38,28	0,01	38,27	— 0,03	— 0,01
30. V.	8½	38,22	+ 0,01	38,23	0,05	38,24	+ 0,02	+ 0,01
	11	38,24	0,00	38,24	0,01	38,24	0,00	0,00
31. V.	11	38,235	— 0,005	38,24	0,00	38,245	+ 0,01	+ 0,005[1]

Aus den angeführten Versuchen geht wohl mit Sicherheit hervor, dafs die Wärmetönung bei der fermentativen Spaltung der Eiweifskörper und des Leims = 0 ist. Ich habe die Versuche in gleicher Weise mit den verschiedensten Eiweifskörpern und Fermentpräparaten wiederholt und zum Teil über Wochen bis zum Verschwinden der Biuretreaktion ausgedehnt. Da die geringsten Störungen in der Regulation des Brutschrankes sich

[1]) Abbruch des Versuches.

gleich sehr unangenehm bemerkbar machen, gelang es nicht immer so gut übereinstimmende Werte zu bekommen, aber alle sprachen in gleicher Weise dafür, dafs keine irgendwie sicher nachweisbare Wärmetönung vorhanden ist.

Da die hydrolytische Spaltung im tierischen Organismus zweifellos ungleich viel rascher und energischer verläuft wie im Brutschrank, sind in biologischer Beziehung die ersten 24 Stunden der Fermenteinwirkung, wo sie sich am kräftigsten äufsert, von hauptsächlichster Bedeutung. Jedoch tritt auch hier keinerlei nachweisbare Wärmetönung auf. Für den Energiehaushalt des Organismus scheint mir diese Tatsache von grofser Bedeutung zu sein. Sie ist ein Beweis für die Zweckmäfsigkeit seiner Einrichtung. Da der Körper aus denselben Elementen, in die er die ihm zugeführten Eiweifskörper spaltet, seine eigenen Eiweifskörper in wesentlich gleicher Weise wieder aufbaut, dürfen wir erwarten, dafs auch bei diesem synthetischen Prozefs keine irgendwie nennenswerte Wärmetönung auftritt. Er vermeidet so das offenbar nutzlose Spiei von Energie, dafs er eine Wärmemenge erst in Freiheit setzt, die er unmittelbar nachher wieder binden mufs. Ferner geht aus der oben erwähnten Tatsache hervor, dafs der Organismus durch die Verdauung der Eiweifskörper keinen Zuwachs an Energie gewinnt, auch nicht vorübergehend.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, dafs dieser Nullwert der Wärmetönung durch die sich gegenseitig aufhebende Einwirkung verschiedener Faktoren mit entgegengesetzten Wärmebewegungen zustande kommt. Alle vermögen wir wohl noch nicht zu übersehen, aber doch wenigstens einige der wichtigsten.

Bei der Quellung von Eiweifs, Albumosen und Gelatine, die möglichst salzfrei gemacht sind, entstehen gut mefsbare und berechenbare Wärmemengen[1]), bei der nachträglichen Lösung findet jedoch Wärmebindung statt. Bei der Verdauung gehen

[1]) Rubner, Zeitschr. f. Biologie. Bd. XXI, S. 307, ferner Pascheles, Pflügers Archiv. Bd. 67, S. 219.

beide Prozesse zum Teil nebeneinander her und heben sich daher wohl bis zu einem gewissen Grade in ihrer Wirkung auf.[1])

Ein dritter Faktor könnte die uns hier besonders interessierende Spaltung des gelösten Eiweifses sein.

Um den Einflufs dieses Prozesses getrennt von Quellung und Lösung zu untersuchen, verdaute ich frisches Pferdeserum mit Pepsin, erhielt aber auch hier keinerlei Anhaltspunkte für eine Wärmetönung. Da zur Prüfung des Pankreassaftes in dieser Richtung das Serum wegen seiner starken Resistenz gegen Trypsin[2]) ungeeignet ist, nahm ich in Wasser gelöstes Hühnereiweifs und Gelatine (vgl. den oben mitgeteilten Versuch), das ja hinsichtlich der Art der Spaltung mit den Eiweifskörpern grofse Ähnlichkeit besitzt. Das Ergebnis war in beiden Fällen das Fehlen einer Wärmetönung.

Ob und welchen Einflufs die im Verdauungsgemisch vorhandenen Salze auf die Wärmebewegung haben, läfst sich nicht bestimmen, da eine wirksame Eiweifsverdauung in einem völlig salzfreien Medium auf die gröfsten Schwierigkeiten stöfst.

Ebensowenig läfst sich mit Sicherheit die Frage beantworten, ob man die von mir bei den verschiedensten, nie chemisch ganz reinen Eiweifspräparaten gewonnenen Resultate auf reine Eiweifskörper, deren Darstellung ja bisher noch nicht einwandsfrei gelungen ist, ohne weiteres übertragen darf. E. Fischer und F. Wrede[3]) haben die Verbrennungswärmen einiger Polypeptide und Aminosäuren bestimmt, und aus ihren Zahlen ergibt sich für die Spaltung chemisch reiner Peptide eine geringe positive Wärmetönung, die leicht mit dem Rubnerschen Silberkalorimeter nachzuweisen wäre; Versuche in dieser Richtung habe ich leider aus äufseren Gründen nicht anstellen können. Bezüglich reiner Eiweifskörper würden sie jedoch ebensowenig wie die

---

[1]) Wiedemann und Lüdeking, Wiedemanns Annalen. N. F. XXV., S. 145.

[2]) Vgl. C. Oppenheimer und H. Aron, Hofmeisters Beiträge. Bd. IV, 7./8. Heft, S. 279.

[3]) A. a. O.

Angaben von Fischer und Wrede einen sicheren Schlufs gestatten.

In biologischer Beziehung sind diese rein chemischen Fragen auch nur von untergeordneter Bedeutung.

Zum Schlufs erlaube ich mir, Herrn Geheimrat Rubner für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse meinen verbindlichsten Dank zu sagen.

Berlin, Mai 1907.

Können lebende Dysenteriebazillen die Eiwand des frischen Hühnereies durchwachsen?

Von

Dr. **Sachs-Müke,**

Oberarzt beim Magdeburgischen Train-Bataillon Nr. 4.

(Aus dem Königlichen hygienischen Institut der Universität Berlin.
Direktor: Geheimer Medizinalrat Prof. Dr. Rubner.)

Die neueren Erfahrungen bezüglich des Eierhandels zu Berlin[1]) haben ergeben, dafs ein grofser Teil der aus Sibirien, dem europäischen Rufsland und Galizien eingeführten Eier häufig halb verdorben ist und dafs auch die sog. Trinkeier alte und nicht recht wohlschmeckende Ware sind. Dies unliebsame Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dafs

1. an Ort und Stelle in den genannten Ausfuhrländern die zur Einfuhr nach Deutschland bestimmten Eier nicht mit derselben Sorgfalt und Rücksicht behandelt werden, wie die nach England und Frankreich einzuführenden Eier;
2. ihr Transport Wochen, ja Monate dauert, und
3. sie auch in Deutschland noch lange im Zwischenhandel liegen.

---

1) Borchmann, Denkschrift betreffend die amtliche Kontrolle des Marktverkehrs mit Eiern. Berlin 1906.

Von seiten der Behörden werden daher energische Maſsregeln zur Verhütung der fortschreitenden Minderwertigkeit der Eier ergriffen werden müssen. Erhöhte Bedeutung würde die polizeiliche Beaufsichtigung des Eierhandels erlangen zu Zeiten, wo in den die Eier ausführenden Ländern Epidemien, wie z. B. im Jahre 1905 Cholera, an unserer Ostgrenze, herrschen. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daſs durch Eier, die aus verseuchten Gegenden stammen, Krankheitskeime eingeschleppt werden. Diese können an der äuſseren Schale haften oder in das Innere der Eier gedrungen sein. Die Möglichkeit der Verschleppung von Choleravibrionen durch Eier ist zuerst durch Stabsarzt Wilm[1]) experimentell nachgewiesen, aber wenig beachtet worden. Das gleiche gilt von den Untersuchungen Piorkowskis[2]) betreffend des Durchdringens der Eier seitens der Typhusbazillen.

Bei der oft hochgradig unreinlichen Behandlung der Eier sollte man sich klar machen, daſs dem Hindurchtreten von Keimen wie anderer schädlicher Substanzen sehr häufig kein ernstes Hindernis entgegensteht. Bei den Handelseiern kommt oft sehr feinschalige Ware in Betracht und man sieht auch allerlei leichte Verletzungen und Schalenrisse. Vor einiger Zeit ist auch die Vermutung ausgesprochen worden, es möchten gelegentlich auch Ruhrbazillen in das Ei eindringen können. Man darf sich aber bei solchen Annahmen nicht von einfachen Analogien leiten lassen; im Gegenteil, ehe nicht eine bestimmte Spezies genauer untersucht ist, wird man ein sicheres Urteil nicht abgeben können. Wenn also im Jahre 1906 von einem Teil der Tagespresse von der Übertragung der Ruhr durch Eier gesprochen wurde, ist das nichts mehr als eine bloſse Annahme.

Bei der Hinfälligkeit der Ruhrbazillen ist eine Übertragung infolge Haftens der Bazillen an der äuſseren Schale bei der langen Transportzeit der meisten Eier kaum wahrscheinlich. Dagegen verdient die Frage, ob lebende Bazillen, namentlich

1) Archiv f. Hygiene, 1895, Bd. XXIII, S. 145.

2) Daselbst, 1895, Bd. XXV, S. 145.

Ruhrbazillen, die Wand des Hühnereies durchwandern können, ein näheres Eingehen auf die Sache.

Um zu einer Beantwortung dieser Frage zu gelangen, wurde von mir unter Verwendung je eines Stammes Shiga und Flexner, die kulturell und durch Agglutination auf ihre Echtheit geprüft waren, sowie unter jeweiliger Abimpfung einer frischen, höchstens 18stündigen Agarkultur, eine Reihe von Versuchen gemacht. Die verwendeten Eier waren sämtlich (November und Dezember!) als frische Trinkeier gestempelt. Die Impfung der Eier geschah, wie von Günther[1]) beschrieben (Verschorfung mit glühendem Messer, Zusiegeln). Bei der Entnahme von Material aus dem Ei wurde so verfahren, dafs von dem der Impfstelle entgegengesetzten Ende aus nach dieser fortschreitend an drei Stellen, dann an der Impfstelle selbst in Bouillon abgeimpft und zuletzt der Inhalt des Eies mit steriler Pipette ausgesogen wurde.

Versuch I.

Bleiben die Bazillen im rohen Ei überhaupt lebensfähig?

Die Impfnadel wurde von der Impfstelle aus in ganzer Länge durch das Ei geführt, so dafs Eiweifs und Dotter infiziert werden konnten. Nach 24 Stunden bis zu 17 Tagen wurden aus den geimpften Eiern Bazillen gezüchtet, die kulturell und durch Agglutination als Ruhr (Shiga bzw. Flexner) festgestellt wurden. Daraus ergibt sich, dafs in künstlich infizierten Eiern sich die Ruhrbazillen bis zu mindestens 17 Tagen lebensfähig halten können.

Versuch II.

Wie weit dringen die Bazillen von einem Punkte aus in das übrige Ei vor?

Es wurden Eier an einem Pol geimpft, aber so, dafs die Nadel nur sehr wenig in das Innere eingeführt wurde. Nach 24 Stunden wurde in Bouillon an den oben bezeichneten Stellen abgeimpft. Aus sämmtlichen Entnahmestellen wurden Ruhr-

1) Günther, Bakteriologie, Leipzig 1906, S. 212.

bazillen gezüchtet. Diese verbreiten sich also von der Impfstelle aus innerhalb von 24 Stunden in dem ganzen übrigen Ei.

Bei anderen, in dieser Weise geimpften Eiern wurde so verfahren, dafs rings um die Mitte der Eier eine 3 mm breite Zone verschorft und mit glühendem Messer geöffnet wurde. Darauf wurden Proben aus dem nun mehr zugängigen Eiweifs und Eigelb entnommen.

In den angelegten Kulturen wurden Ruhrbazillen gefunden, die hiernach von der Impfstelle aus, gleichfalls in 24 Stunden, sowohl in das Eiweifs als auch in das Eigelb vorgedrungen waren.

Versuch III.

Welchem Einflufs unterliegen unverletzte Eier, die in frische Nährbouillon mit Ruhrbazillen gelegt sind.

In solche Bouillon wurde eine ganze Anzahl von Eiern gelegt, die nach verschieden langem, bis zu dreiwöchigem Verweilen darin, untersucht wurden.

Dabei ergab sich, dafs während dieser Zeit die Nährbouillon stets lebensfähige Ruhrbazillen enthielt, die also hinreichend Gelegenheit hatten, bei Erschöpfung der Nährflüssigkeit in das Innere der Eier und zu ihren noch unverbrauchten, aufserordentlich guten Nährstoffen vorzudringen. Es fanden sich in dem Innern der Eier aber niemals Ruhrbazillen. Dagegen gelang es, wenn man die äufsere Eischale, die vorher mit sterilem Fliefspapier abgetrocknet wurde, in Bouillon brachte, Ruhrbazillen nachzuweisen, die nur aus der Nährbouillon stammen konnten. In zwei Fällen wurden nach 3 Wochen aus dem Innern der Eier durch das Plattenverfahren Kartoffelbazillen, aber keine Ruhrbazillen gezüchtet, während in der Nährbouillon noch lebende Ruhrbazillen vorhanden waren. Zur Kontrolle, ob in diesen beiden Fällen die Fäulniserreger nicht durch eine ungenügende Reinigung der betreffenden Eier von der äufseren Schale her in das Innere eingedrungen waren, wurden folgende Versuche gemacht:

1. Wie oben angegeben gereinigte Eier wurden in sterile Bouillon gelegt. Es waren nach 3 bzw. 8 Tagen die Eier und ihr Inhalt keimfrei.
2. Nur mit Wasser abgewaschene Eier wurden in sterile Bouillon gelegt. Nach denselben Zeiträumen wurden aus der Bouillon und von der äufseren Schale gelbe Kolonien bildende Kokken gezüchtet, während die von der Schalenhaut, dem Eiweifs und dem Eigelb entnommenen Proben keimfrei waren.

Hiernach ist es als erwiesen zu erachten, dafs aus Nährbouillon stammende Ruhrbazillen nicht in das unverletzte Ei einwandern, auch nicht, wenn es faul, d. i. durch andere Keime vorher infiziert war.

Versuch IV.

Wie verhalten sich Sprungeier bei Versuch III?

Unverletzte Eier wurden nach Anbringung kleiner künstlicher Öffnungen und kaum sichtbarer Sprünge in die Nährbouillon gelegt. Am andern Tage wurde von der der Öffnung gegenüberliegenden Stelle abgeimpft. Es wurden durch die Kultur Ruhrbazillen nachgewiesen.

Die Bazillen waren also in diesen Fällen nicht durch die Schale, sondern mittels der Bouillon durch die vorhandenen Öffnungen bzw. Sprünge in das Eiinnere vorgedrungen. Unzweifelhaft werden durch den Transport der Eier auch solche kleine, dem Auge kaum oder gar nicht erkennbaren Sprünge hervorgerufen, so dafs bei unverletzter Schalenhaut (Knickeier) einerseits das Auslaufen des Eiinneren verhindert, anderseits das Eindringen von Keimen, auch von pathogenen, ermöglicht wird. Eine reine Infektion der Eier mit Ruhrbazillen dürfte aber wohl äufserst selten sein, da die bestehende Eingangspforte auch vielen anderen Keimen offen ist. Solche Eier würden sich schon äufserlich durch ihre Verderbnis als genufsunfähig bemerkbar machen. Durch das Vorhandensein kleinster, auf dem Transport entstandener Verletzungen der Schale erklärt sich auch die Ansteckung gesunder Eier durch benachbarte ausgelaufene faule.

Versuch V.

Können im Eiinnern vorhandene Ruhrbazillen durch Kochen der Eier unschädlich gemacht werden?

Zu diesem Versuche wurden infizierte Eier verwendet, deren Inhalt auf das Vorhandensein von lebensfähigen Ruhrbazillen geprüft war. Die versiegelte Öffnung wurde noch aufserdem zum Schutze gegen das heifse Wasser mit einer dicken Schicht Gips umgeben. Die Eier wurden weich gekocht (2 Minuten), wachsweich (4 Minuten), hart (6 Minuten). Nach dem Kochen konnten weder aus dem Eiweifs noch aus dem Eigelb Ruhrbazillen gezüchtet werden. Dies entspricht der geringen Widerstandsfähigkeit der Ruhrbazillen. Es waren nun noch die Temperaturen im Eiinnern zu bestimmen, die zur Abtötung der Ruhrbazillen nötig sind. Verschiedene hierüber angestellte Versuche ergaben, dafs das Eiweifs des Hühnereies bei 64° gerinnt, die wachsweiche Konsistenz des Eigelbs bei etwa 75° eintritt, und das Eigelb bei 78 bis 80° völlig hart wird.

An und für sich ist das Hartwerden des Eies kein bestimmtes Kriterium dafür, dafs eine bestimmte Temperatur eingewirkt hat. Ein Kibitzei ist z. B. nach 10 Minuten langem Kochen noch weich. Da ist es denn auch denkbar, dafs bei Hühnereiern, ganz abgesehen von der Dicke der Schale auch die Rasse einen Einflufs auf das Gerinnen des Gelbeies, hervorgerufen durch geringe Unterschiede in seiner chemischen Zusammensetzung, besitzt. Zu berücksichtigen ist auch der Umstand, dafs auf das Ei eine sich allmählich steigernde, bei hinreichend langem Kochen 100° betragende Hitze einwirkt.

Jedenfalls ist als erwiesen zu betrachten, dafs für Ruhrbazillen, und für viele andere Mikroorganismen auch, das hartgekochte Ei als absolut steril gelten kann.

Versuch VI.

Wie verhalten sich an der äufseren Eischale angetrocknete Ruhrbazillen?

Es wurden Eier in Bouillonkultur von lebenskräftigen Ruhrbazillen getaucht und in ein steriles Glas entweder auf trockenes steriles Fliefspapier oder auf mit steriler physiologischer Koch-

salzlösung angefeuchtetes gelegt. Die Bazillen hatten also Gelegenheit, an der äufseren Eischale zu haften. Die Eier kamen in den Brutschrank bei 37°, also bei Ausschlufs des Lichtes in trockener bzw. feuchter Atmosphäre unter die für die Entwicklung der Bazillen günstigsten Bedingungen. Die Eier blieben bis zu 10 Tagen im Brutschrank. Bei allen waren die aus dem Eiinneren und die von der Eihaut entnommenen Proben nach fünftägigem Verweilen der Bouillonkulturen im Brutschrank keimfrei. Die von der äufseren Schale entnommenen Proben hatten die Bouillon nach 2 Tagen getrübt. In den aus diesen getrübten Bouillonkulturen gefertigten Platten konnten Ruhr- und Kartoffelbazillen nachgewiesen werden. Von der äufseren Schale derjenigen Eier, die acht Tage lang trocken aufbewahrt wurden, konnten Ruhrbazillen nicht mehr nachgewiesen werden, was mit der Tatsache übereinstimmt, dafs sich Ruhrbazillen in trockenem Zustand nicht länger als 8 bis 10 Tage halten.[1]) Also auch an der äufseren Schale angetrocknete Ruhrbazillen vermögen nicht in das Innere des Eies vorzudringen, trotzdem ihnen ein in jeder Beziehung günstiger Nährboden in nächster Nähe winkt.

Aus vorstehenden Versuchen ergibt sich, dafs lebende Ruhrbazillen die Wand des frischen, unverletzten Hühnereies nicht zu durchwandern vermögen, dafs sie bei ihrer geringen Lebensfähigkeit und dem langen Transport, sowie der Zeit, wo sich die Eier im Zwischenhandel befinden, an der äufseren Eischale höchst wahrscheinlich absterben und dafs sie in Knickeiern durch Hartkochen vernichtet werden, falls die Eier in diesem Falle durch das Eindringen anderer Organismen sich nicht schon auch den groben Sinnen als verdorben zu erkennen gegeben haben.

Aber man wird sich die Krankheitsübertragung durch Eier, wie auch andere ähnlicher Natur, nur als Ausnahmefälle vorstellen müssen. Hunderte von Verschleppungen von Infektions-

1) Kolle, Hetsch, Die experimentelle Bakteriologie u. die Infektionskrankheiten. S. 195.

erregern bleiben ohne Erfolg, bis eine zu ihrem Ziele gelangt und eine Ansteckung hervorruft. Die Gefahren steigen natürlich beim Genufs halbgarer oder auch roher Eier. Bei den beiden letzteren konnten ja die Giftstoffe in das Ei gekommen sein, wobei es sich möglicherweise um Toxine handeln kann, die der Siedehitze standhalten.

Unter der minderen importirten Ware spielen die Fleckeier eine wichtige Rolle. Nach Borchmann[1]) werden in Fleckeiern häufig Schimmel- und Hefepilze gefunden. Ihre Keime sollen besonders bei Kühlhauseiern und Eiern dritter Sorte nach Auflösung des die Kalkschale überziehenden Oberhäutchens (cuticula) sich aus der Luft auf dem Ei niederschlagen und ihre Mycelien durch die Porenkanäle der Kalkschale und durch die Schalenhaut in das Eiinnere treiben.

Sehr häufig sind auch die bakteriellen Infektionen, die von Schrakamp und dann von Zörkendörfer[2]) näher untersucht worden sind. Dabei ist namentlich auch eine im Innern des Huhnes stattfindende Infektion der Eier zugegeben. Es ist auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dafs Keime, die während der Bildung der Kalkschale in diese, bzw. an ihrer Innenwand, abgelagert wurden, von hier aus in das Ei einwandern, wenn dieses seine natürliche Widerstandskraft eingebüfst hat. Bei den innigen anatomischen Beziehungen, wie sie bei Vögeln durch die Kloake zwischen Darm- und Geschlechtsorganen bestehen, halte ich die Verderbnis der Eier durch eine im mütterlichen Organismus stattfindende Infektion für viel wahrscheinlicher und häufiger als eine ektogene. Ich behalte mir vor, weitere Versuche in dieser Richtung anzustellen.

Der mangelnde Beweis einer solchen Schädlichkeit derartiger Eier beruht vielleicht eben auf mangelhafter Beobachtung. Wenn man sich vielleicht einmal mehr an den Gedanken gegewöhnt haben wird, dafs auch Eier schädlich sein können, wird man bei genauerem Zusehen vielleicht in Zukunft auch

1) S. o. daselbst auch ausführliche Literaturangabe.

2) Archiv f. Hygiene, 1893, Bd. XVI, S. 367.

Eiintoxikationen finden, wie man solche Intoxikationen bei vielen anderen Nahrungsmitteln, die noch lange nicht so gute Bakteriennährböden, wie gerade die Eier sie sind, gefunden hat.

Von diesem Gesichtspunkte aus ist die Frage noch gar nicht entschieden, ob z. B. bei den Vergiftungen mit Vanilleeis es nicht Fälle von Intoxikationen durch verdorbene Eisubstanz gibt. Die genannten Vergiftungen brauchen keineswegs ihre Ursache in der Vanille oder in der verdorbenen Milch zu haben, sondern können auch durch die verdorbenen Eier bedingt sein.[1]) Minderwertige Eier werden besonders häufig im Bäckereibetrieb verendet.[2])

Um nun zu sehen, ob Schimmelpilze von der äufseren Eischale aus in das Innere des Eies vorzudringen vermögen, wurden frische, mit Gelatine überzogene Eier in Reinkulturen von Schimmelpilzen gewälzt und dabei nach fünftägigem Verweilen im Brutschrank folgende Ergebnisse erzielt:

Reinkulturen von:	Inhalt	
	A bei unverletzter Schale	B bei Knickeiern
Mucor corymbifer . . .	keimfrei	infiziert
Aspergillus niger . . .	»	»
Penicillium glaucum . .	»	»
Penicillium brevicaule . .	»	»

Bei A war also der Inhalt stets keimfrei geblieben. Bei B war er fade, muffig riechend, von grauen bzw. schwärzlichen Krümeln durchsetzt. Die Schimmelpilze waren überall an der äufseren Schale auf der Gelatine gewachsen. Von dem Inhalt wurde bei A und B nochmals auf Agar abgeimpft. Diese Impfung war bei A, wo auch für das blofse Auge und den Geruch das Innere gut war, ergebnislos. Bei B wurden wieder Reinkulturen der verwendeten Schimmelpilze erzielt.

1) Vergl. auch Vagedes, Paratyphusbazillen bei einer Mehlspeisenvergiftung (Enteneier). Beiträge zur Typhusforschung. Abdruck aus dem klinischen Jahrbuch. Bd. 14.

2) Borchmann s. o.; Ostertag, Das Veterinärwesen der Vereinigten Staaten von Nordamerika. Berlin 1906.

Hieraus ergibt sich wieder der Schlufs, dafs die geprüften Schimmelpilze die unverletzte Wand des frischen Hühnereies nicht zu durchdringen vermögen. Es ist damit aber nicht gesagt, dafs sich alle Eier wie die untersuchten verhalten müssen, denn die Eischale ist bei verschiedenen Hühnerspezies recht verschieden; noch auch kann ich behaupten, dafs alle Schimmelpilze sich wie diejenigen, die ich zum Experimente wählte, verhalten werden. Zum mindesten genügen die leichtesten Läsionen, um ein Durchwachsen zu ermöglichen.

Die angestellten Versuche ergaben, dafs es zweifellos erwünscht sein mufs, dem internationalen Eierhandel vermehrte Aufmerksamkeit zuzuwenden.

Ich schliefse damit, Herrn Geheimrat Rubner für die mir gütigst überwiesene Arbeit und sein ständiges reges Interesse an ihr, sowie Herrn Stabsarzt Berghaus für die liebenswürdige Kontrolle meiner Versuche meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Über Bakterienagglutination durch normale Sera.

Von

Dr. med. **Emil Bürgi**,

Professor in Bern.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Berlin. Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Rubner.)

Die normale Agglutination einer gröfseren Anzahl Bakterien durch verschiedene Tiersera ist niemals systematisch untersucht worden. Man findet in der Literatur allerdings eine beträchtliche Menge von mehr oder minder vereinzelten Angaben über Normalagglutinine, auf die ich später noch genauer eingehen werde, nirgends aber zusammenfassende Untersuchungen. Dr. U. Friedemann, dem ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für seine vielen wertvollen Ratschläge bei der Ausführung der Ver suche meinen herzlichsten Dank ausspreche, machte mich auf diese Lücke in unseren Kenntnissen über das Wesen der Agglutination aufmerksam. Ich habe durch mehrere längere Untersuchungsreihen unser Wissen nach dieser Richtung hin zu ergänzen gesucht und will über die Resultate dieser Experimente um so lieber berichten, als ich glaube, einige nicht unwesentliche neue Tatsachen gefunden zu haben.

Ich habe die normale Agglutinationskraft zehn verschiedener Sera, nämlich der Sera von Meerschweinchen, Mensch, Kaninchen, Hund, Gans, Huhn, Hammel, Ziege, Pferd und Rind untersucht. (Das Meerschweinchenblut entnahm ich der Karotis, das Kaninchenblut der Ohrvene, das Hunde- und Ziegenserum der Jugularis und das Gänseserum anfänglich der Flügelvene des

betreffenden Tieres, später bezog ich das letztere ebenso wie die anderen Blutarten aus dem Schlachthof; das menschliche Blut erhielt ich durch die Güte einiger Assistenten der zweiten medizinischen Klinik Berlins.) Die aus diesen Blutarten nach den üblichen Methoden gewonnenen Sera wurden vor dem Gebrauch in einem auf 56° erwärmten Wasserbade inaktiviert, um die störenden Bakteriolysine zu entfernen. Hier und da verwendete ich allerdings neben dem inaktiven auch aktives Serum und fand die Agglutination durch die Sera in diesen zwei Zuständen jedesmal sehr wenig verschieden. Die in den Tabellen angeführten Resultate wurden aber ausschliefslich mit inaktiviertem Serum gewonnen. Die Sera wurden immer im Eisschrank aufbewahrt, fingen sie an, sich zu trüben, so wurden sie sogleich durch frisches Material ersetzt.

In meinen Versuchsreihen kamen 19 verschiedene Bakterienarten zur Verwendung und zwar jedesmal 4 Agarstrichkulturen (bei Rotz Pferdefleischagarkulturen), die 24 Stunden nach der Überimpfung in 40 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, durch Zusatz von 0,4 ccm Formalin getötet, filtriert und im Eisschrank aufbewahrt worden.

Die Agglutination dieser Bakterien wurde in acht verschiedenen Serumkonzentrationen geprüft, nämlich in den Konzentrationen $^1/_1$, $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$, $^1/_{16}$, $^1/_{32}$, $^1/_{64}$ und $^1/_{128}$. Die Sera wurden zu diesem Zwecke mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Auf je 1 ccm dieser Serumlösungen kam 1 ccm Bakterienaufschwemmung. Die Flüssigkeiten wurden gut durchgeschüttelt, 2 Stunden in den Brutschrank gestellt, dann einige Stunden (meist den ganzen Nachmittag) bei Zimmertemperatur gehalten und nachts im Eisschrank aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde die Agglutination, die schon vorher von Zeit zu Zeit beobachtet worden war, genau festgestellt und notiert. Diese Aufzeichnungen, die man in den Tabellen wiedergegeben findet, benutzte ich zu meinen vergleichenden Betrachtungen. Nur die wenigsten Bakterien waren schon nach 2stündigem Stehen im Brutschrank agglutiniert, bei dem von mir gewählten Zeitpunkt der Untersuchung dagegen alle ohne Ausnahme, so dafs er für die Beurteilung der verschiedenen Agglutinationen jedenfalls richtig gewählt

schien. Ich habe, wie üblich, drei Grade der Agglutination, die ich nur makroskopisch untersuchte, unterschieden, der stärkste Grad (Ausfällen der Bakterien in kompakten Klümpchen, absolute Klärung der Suspensionsflüssigkeit) wurde in den Tabellen mit ×, der zweitstärkste (Ausfallen der Bakterien in weniger kompakten Massen, absolute Klärung der Flüssigkeit) mit = und der schwächste Grad (geringe Fällung der Bakterien, keine vollständige Klärung) mit + bezeichnet. Aus dieser Einteilung geht hervor, dafs der erste und zweite Grad als ziemlich gleichwertig zu betrachten sind. Der dritte, niedrigste Agglutinationsgrad war der einzige, der hier und da mit einfachen Sedimentierungen hätte verwechselt werden können, doch wurde die übliche Prüfung auf Sedimentierung nie versäumt[1]) und das Ansetzen verschiedener Kontrollproben, die vor wesentlichen Fehlern schützten, niemals unterlassen.

Ich untersuchte in einer ersten Reihe die Wirkung der zehn oben angegebenen Sera auf den Choleravibrio, den Vibrio Metschnikoff, auf drei verschiedene Dysenteriestämme (in den Tabellen als Dysenterie A, B und M bezeichnet), auf den Bac. des Typhus abd., des Paratyphus B, auf Koli, Mäusetyphus, Schweinepest, Hühnercholera, Proteus, Pyocyaneus und Staphylococcus aureus, und lasse hier die Resultate dieser ersten Serie folgen:

Versuchsreihe I. 1. Cholera.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	+	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	+	—	—	—	—	—	—	—
Hund	+	+	+	—	—	—	—	—
Gans	+	+	—	—	—	—	—	—
Huhn	+	+	—	—	—	—	—	—
Hammel	=	+	—	—	—	—	—	—
Ziege	×	×	×	—	—	—	—	—
Pferd	×	×	×	=	—	—	—	—
Rind	×	×	×	=	—	—	—	—

1) Vgl. die Angaben von Kolle und Otto in ihrer Publikation: »Die Differenzierung der Staphylokokken mittels der Agglutination. Zeitschrift f. Hygiene, 41, 369.

2. Vibrio Metschnikoff.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	?	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	?	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	+	+	—	—	—	—	—	—
Hund	+	—	—	—	—	—	—	—
Gans	+	+	+	—	—	—	—	—
Huhn	nicht untersucht.							
Hammel	nicht untersucht.							
Ziege	×	×	=	+	—	—	—	—
Pferd	×	=	+	?	—	—	—	—
Rind	×	=	+	+	+	+	—	—

3. Dysenterie.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	=	=	+	—	—	—	—	—
Mensch	+	+	=	+	+	+	—	—
Kaninchen	—	—	+	+	=	=	+	+
Hund	=	+	—	—	—	—	—	—
Gans	—	—	—	—	+	=	+	—
Huhn	nicht untersucht.							
Hammel	nicht untersucht.							
Ziege	+	+	+	+	=	=	×	=
Pferd	—	—	—	—	+	+	=	+
Rind	—	+	+	+	=	=	=	×

4. Dysenterie B.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	+	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	—	+	+	=	=	×	+	—
Kaninchen	—	—	—	+	+	=	=	×
Hund	—	—	—	—	+	+	=	×
Gans	—	—	—	+	×	×	=	×
Huhn	—	—	—	+	×	×	=	=
Hammel	—	—	+	+	=	=	×	+
Ziege	—	—	—	+	+	×	×	=
Pferd	—	—	+	+	=	=	×	×
Rind	—	—	+	+	=	=	×	×

5. Dysenterie M.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Meerschweinchen . . .	—	—	—	=	+	+	—	—
Mensch	+	+	+	=	=	=	=	=
Kaninchen	—	—	+	+	—	—	—	—
Hund	=	—	+	=	=	+	+	+
Gans	—	+	+	=	×	×	=	=
Huhn	—	—	—	+	×	×	=	=
Hammel	+	=	=	×	×	×	×	=
Ziege	+	+	+	+	=	×	×	×
Pferd	—	+	+	+	=	×	×	×
Rind	—	—	+	+	+	=	=	=

6. Typhus abd.

Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	+	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	+	?	—	—	—	—	—	—
Hund	+	+	+	—	—	—	—	—
Gans	×	×	=	+	—	—	—	—
Huhn	nicht untersucht.							
Hammel	nicht untersucht.							
Ziege	=	=	+	+	—	—	—	—
Pferd	×	×	=	+	+	+	+	—
Rind	×	×	×	×	+	+	—	—

7. Paratyphus B.

Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	+?	—	—	—	—	—	—	—
Hund	+?	—	—	—	—	—	—	—
Gans	—	—	—	—	—	—	—	—
Huhn	—	—	—	—	—	—	—	—
Hammel	+	—	—	—	—	—	—	—
Ziege	=	=	—	—	—	—	—	—
Pferd	×	×	—	—	—	—	—	—
Rind	=	+	—	—	—	—	—	—

8. Koli.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	+	+	–	–	–	–	–	–
Mensch	+	+	–	–	–	–	–	–
Kaninchen	+	–	–	–	–	–	–	–
Hund	×	=	=	=	–	–	–	–
Gans	×	=	=	+	+	–	–	–
Huhn	×	=	+	+	–	–	–	–
Hammel	×	×	×	×	×	×	=	+
Ziege	×	×	×	×	×	×	×	=
Pferd	×	×	×	×	×	×	×	–
Rind	×	×	×	×	×	×	×	=

9. Mäusetyphus.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	+?	–	–	–	–	–	–	–
Mensch	=	=	+	–	–	–	–	–
Kaninchen	–	–	–	–	–	–	–	–
Hund	+	+	–	–	–	–	–	–
Gans	=	+	–	–	–	–	–	–
Huhn	=	+	+	–	–	–	–	–
Hammel	×	=	=	=	=	–	–	–
Ziege	×	×	×	=	+	–	–	–
Pferd	×	×	×	=	–	–	–	–
Rind	×	×	×	=	=	–	–	–

10. Schweinepest.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	–	–	–	–	–	–	–	–
Mensch	–	–	–	–	–	–	–	–
Kaninchen	–	–	–	–	–	–	–	–
Hund	–	×	×	=	=	–	–	–
Gans	–	–	–	–	–	–	+?	+?
Huhn	–	–	–	–	–	–	–	–
Hammel	×	×	×	×	×	=	+	–
Ziege	×	×	×	×	×	=	+	–
Rferd	×	×	×	–	+	–	–	–
Rind	×	×	×	×	=	–	–	–

11. Hühnercholera.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	+	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	—	—	—	—	—	—	—	—
Hund	+	+	+	+	—	—	—	—
Gans	+	—	—	—	—	—	—	—
Huhn	+	—	—	—	—	—	—	—
Hammel	+	+	—	—	—	—	—	—
Ziege	—	—	×	+	—	—	—	—
Pferd	×	×	+	—	—	—	—	—
Rind	×	×	+	—	—	—	—	—

12. Proteus.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	+	?	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	+	+	—	—	—	—	—	—
Hund	×	×	×	—	—	—	—	—
Gans	×	×	=	—	+	—	—	—
Huhn	×	×	×	=	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	×	+	—	—	—
Ziege	×	×	×	×	—	+	—	—
Pferd	×	×	=	=	+	—	—	—
Rind	×	×	×	—	—	+	—	—

13. Pyocyaneus.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	+?	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	+	+?	+?	—	—	—	—	—
Kaninchen	+?	+?	—	—	—	—	—	—
Hund	=	+?	—	—	—	—	—	—
Gans	×	×	+	—	—	—	—	—
Huhn	×	—	=	=	—	—	—	—
Hammel	×	×	=	+	—	—	—	—
Ziege	×	×	×	×		+	—	—
Pferd	×	×	×	×	—	—	—	—
Rind	=?	×	×	×	×	=	—	+

14. Staphylococcus aureus.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	—	—	—	—	—	—	—	—
Hund	=	+	—	—	—	—	—	—
Gans	—	+	+	+	—	—	—	—
Huhn	=	=	+	+	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	- -	—	—	—	—
Ziege	×	×	×	=	—	—	—	—
Pferd	—	—	+	=	×	=	—	—
Rind	—	—	+	=	×	=	—	—

Schon in dieser ersten Versuchsreihe trat die später eingehend zu besprechende Gesetzmäfsigkeit deutlich zutage. Für jedes Bakterium waren es immer die gleichen Sera, welche stark, die gleichen, welche mittelstark und die gleichen, welche nur wenig oder gar nicht agglutinierten. Als ganz besonders wirksam erwiesen sich jedesmal die Sera von Pferd und Rind; am nächsten standen ihnen die von Ziege und Hammel. Bei einer genaueren Durchsicht der Resultate zeigte es sich dann sogar, dafs sich die Sera ihrer Agglutinationsfähigkeit nach in eine Reihe gliedern lassen, die für sämtliche von mir untersuchten Bakterienarten immer annähernd dieselbe blieb. Am stärksten agglutinierte das Rinderserum, dann folgten, nach absteigendem Agglutinationsvermögen geordnet, die Sera von Pferd, Ziege, Hammel, Huhn, Gans, Hund, Kaninchen, Mensch und Meerschweinchen. Diese Tatsache schien so überraschend und interessant, dafs es mir zunächst wichtig war, durch Nachprüfungen festzustellen, ob die wenigen Abweichungen von dieser Regel auf Zufälligkeiten zurückzuführen oder als wirkliche Ausnahmen zu betrachten seien. Leider war das mir zur Verfügung stehende Material in dem Moment nicht reichlich genug, um alle notwendigen Nachprüfungen ohne Ausnahme vornehmen zu können, doch genügte es, um wenigstens die gröfste Zahl der Abweichungen aufzuklären. Ich lasse hier vorderhand die Ergebnisse dieser Nachuntersuchungen folgen:

Nachprüfungen.

1. Cholera.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Hund	+	+	+	−	−	−	−	−
Gans	=	+	+	−	−	−	−	−
Huhn	+	+	+	+	−	−	−	−
Hammel (altes Serum)	=	−	+	−	−	−	−	−
Hammel (neues Serum)	×	×	+	−	−	−	−	−

2. Vibrio Metschnikoff.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Kaninchen	−	−	−	−	−	−	−	−
Hund	=	+	−	−	−	−	−	−

3. Dysenterie.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Huhn	−	−	−	+	+	×	×	+
Hammel	−	×	×	×	×	×	=	+

4. Dysenterie B.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Hund	−	+	−	+	+	−	=	+
Gans	−	−	−	+	−	×	×	×
Ziege	−	×	×	×	×	×	×	+
Pferd	−	−	+	+	−	×	×	×
Rind	−	−	+	+	−	−	×	×

5. Dysenterie M.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$	
Meerschweinchen	−	−	−	−	−	−	−?	−?	Sediment?
Hund	−	−	−?	−	−?	−	−	−	− ?
Hammel	−	+	+		×	×	−	−	
Ziege	−	+	+	−	×	×	×	−	
Pferd	−	−	−	−	+	−	−	×	

6. Typhus abdominalis.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Gans	×	×	×	=	=	—	—	—
Huhn (fault)	×	—	=	+	—	—	—	—
Hammel (altes Serum)	×	×	×	+	—	—	—	—
Hammel (neues Serum)	×	×	×	×	+	—	—	—
Pferd	×	×	×	×	=	+	—	—
Pferd u. Meerschweinchen	×	×	×	—	+	—	—	—

7. Paratyphus B.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Gans	×	×	×	+	+	+	—	—
Huhn	×	=	=	+	+	—	—	—
Hammel	×	×	×	=	+	—	—	—
Pferd	×	×	×	=	+?	—	—	—
Rind	×	×	×	×	+?	—	—	—

8. Mäusetyphus.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	—	—	—	—	—	—	—	—
Hund	—	—	—	—	—	—	—	—
Huhn	—	—	—	—	—	—	—	—

9. Schweinepest.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Hund	+	+	+	+	+	+	—	—
Gans	=	=	—	+	—	—	—	—
Huhn	×	×	=	+	—	—	—	—
Hammel	×	—	=	=	=	+	+	—?
Pferd	×	×	×	×	×	=	+	—
Rind (frisches Serum)	×	×	×	×	×	×	=	+?
Rind (altes Serum)	×	×	×	×	+?	+	—	—

10. Proteus.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Pferd	×	×	×	×	-	+	—	—
Rind	×	×	×	×	×	+	+	—?

Weitere Nachprüfungen.

11. Vibrio Metschnikoff.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Gans	+	+	+?	—	—	—	—	—
Huhn	+	+?	—	—	—	—	—	—
Hammel	=	+	-	—	—	—	—	—
Pferd	×	+?	+?	+	—	—	—	—

12. Typhus abdominalis.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Huhn (frisch)	=	=	+	—	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	=	+	—	—	—
Pferd	×	×	×	=	+	—	—	—
Pferd (neues Serum)	×	×	×	×	=	—	—	—

Der Choleravibrio war in meiner ersten Versuchsreihe von Gänse- und Hühnerserum sowie auch von Hammelserum relativ wenig agglutiniert worden. Gänse- und Hühnerserum agglutinierten sogar etwas weniger als Hundeserum. Durch die Nachprüfungen wurde die richtige Reihenfolge hergestellt. Kaninchenserum hatte in der Versuchsreihe I den Vibrio Metschnikoff in den drei ersten Verdünnungen agglutiniert, Hundeserum nur in den zwei ersten, bei der zweiten Untersuchung war das Verhältnis dieser beiden Sera umgekehrt. Huhn- und Hammelserum hatte ich das erste Mal in ihrer Wirkung auf den Dysenteriestamm A gar nicht geprüft, die Nachprüfung dieser zwei Sera reihte sie ganz nach der oben angeführten Regel ein. Das Hundeserum, das für diesen Bazillus ein etwas abweichendes Verhalten gezeigt hatte, konnte ich leider im Moment nicht nocheinmal verwenden. Da bei Dysenterie B keine nennenswerten Abweichungen von dem Gesetz vorgekommen waren, konnten die Nachuntersuchungen hier nur die Richtigkeit der ersten Reihe bestätigen. Bei Dysenterie M. hatte das Kaninchenserum ein etwas unregelmäſsiges Verhalten gezeigt, ich konnte die Untersuchung des Serums momentan nicht wiederholen, doch zeigte die Nachprüfung von Meerschweinchen- und Hundeserum, daſs in der ersten Reihe offenbar Sedimentierungen mit Aggluti-

nationen verwechselt worden waren. Die agglutinierende Wirkung von Hammel- und Huhnserum auf Typhus abdominalis war in der ersten Serie noch nicht untersucht worden; sie erfolgte bei den Nachuntersuchungen dem genannten Gesetze gemäfs. Huhnserum agglutinierte allerdings etwas weniger als Gänseserum, auch als ich das schon etwas trübe Huhnserum durch frisches ersetzt hatte. (Im allgemeinen war nämlich das etwas unregelmäfsige Verhalten dieser beiden Sera, die mir gewöhnlich vom Markt geliefert wurden, durch ihre Neigung, leicht in Fäulnis überzugehen, zu erklären.) Bei der zweiten Untersuchung der Agglutination des Typhusbazillus liefs ich das eine Mal frisches, das andere Mal altes Pferde- und Hammelserum einwirken. Das frische (ebenfalls inaktivierte) Serum agglutinierte jedesmal etwas stärker. Diese Tatsache konnte ich auch bei Cholera für Hammelserum und bei Schweinepest für Rinderserum konstatieren. Paratyphus B wurde im ganzen wenig agglutiniert, bei der einen Versuchsreihe agglutinierten nur die Sera von Hammel, Ziege, Pferd und Rind, bei der anderen auch die von Gans und Huhn. Bacillus coli und der Bacillus des Mäusetyphus verhielten sich im allgemeinen der Regel gemäfs, sie wurden nur in der ersten Versuchsreihe durch menschliches Serum etwas stärker als anzunehmen war, gefällt, doch war die Abweichung vom Gesetz eine relativ geringe. Eine Nachprüfung konnte nicht vorgenommen werden, da ich kein menschliches Serum mehr zur Verfügung hatte. Bei dem Bazillus der Schweinepest wurde das zuerst beobachtete, etwas aus der Reihe fallende Verhalten der Sera von Hund, Gans und Huhn durch die erneuerte Untersuchung einigermafsen korrigiert.

Über die Agglutination der anderen Bakterien (Hühnercholera, Proteus, Pyocyaneus, Staphylokokkus) ist nichts beizufügen, sie verlief mit ganz minimalen Schwankungen, der angeführten Regel entsprechend.

Bei einigen Agglutinationsreihen wurde die eigentümliche Erscheinung der Hemmung in starken Serumkonzentrationen beobachtet, in geringem Grade bei B. pyocyaneus und bei Staphylococcus aureus, in hohem, ja sogar in aufsergewöhn-

lich starkem Maſse bei den verschiedenen Dysenteriestämmen, namentlich bei Dysenterie A und B — weniger bei Dysenterie M. Es ist klar, daſs Hemmung in starken Konzentrationen bei Agglutination in geringeren Konzentrationen mit dem gewöhnlichen Ausbleiben der Fällung nicht identifiziert werden kann, sie könnte eher als Agglutination in ihrer höchsten Potenz bezeichnet werden, obwohl das auch nicht ganz richtig wäre. Bekanntlich treffen wir Hemmungszonen auch beim Ausfällen kolloidaler Stoffe. Erklärt ist die Erscheinung bei der Agglutination durchaus noch nicht genügend, doch hat es keinen Zweck, hier auf die Frage näher einzugehen, da meine Arbeit über diesen Punkt keine neuen Tatsachen gebracht hat; ich möchte an der Stelle nur ausdrücklich betonen, daſs Hemmung eher auf ein Plus als auf ein Minus von Agglutinin schlieſsen läſst. Gerade deshalb aber konnte man glauben, die Sera, die, wie z. B. Meerschweinchenserum, wenig agglutinierten, enthielten nicht zu wenig agglutinierende Substanz, sondern das Ausbleiben der Agglutination sei auch hier durch auſsergewöhnlich starke Hemmungen bedingt, die noch in groſsen Verdünnungen die Fällung der Bakterien verhinderten. Diese Frage lieſs sich auf zwei verschiedenen Wegen lösen. Man konnte die normale Agglutination durch ein Serum mit schwachem Agglutinationsvermögen in noch gröſseren Verdünnungen prüfen oder sehen, ob ein Zusatz von einem wenig wirksamen Serum zu einem hochagglutinierenden die Agglutinationskraft des letzteren stärker herabsetzt als ein entsprechender Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung. Ich wählte den zweiten Weg und prüfte den Einfluſs einer Mischung von Pferde- und Meerschweinchenserum auf den Typhusbazillus. Der Zusatz des wenig wirksamen Meerschweinchenserums zu dem stark agglutinierenden Pferdeserum wirkte aber nur im Sinne einer Verdünnung mit einer indifferenten Flüssigkeit, das geringe Fällungsvermögen des Meerschweinchenserums beruht also nicht auf hemmenden Eigenschaften sondern auf einem Mangel an Agglutinin.

Die Nachprüfungen hatten also die meisten — allerdings nicht alle — Abweichungen von dem aus der ersten Versuchs-

reihe hervorgegangenen Gesetz als auf Versuchsfehler verschiedener Art zurückzuführende Zufälligkeiten aufgeklärt und damit auch aufgehoben. Immerhin schien es doch angezeigt, die gewonnenen Resultate durch eine weitere Versuchsreihe zu erhärten, und es schien möglich, eine noch gröfsere Übereinstimmung der Ergebnisse zu erzielen, wenn man die ganze Serie mit möglichst frischen und gleichartigen Sera vornehmen konnte. Ich hatte durch meine Nachuntersuchungen festgestellt, dafs die Sera, wie übrigens zu erwarten war, im Laufe einiger Wochen, auch ohne dafs sie faulten, an Wirksamkeit einbüfsten, ferner war anzunehmen, dafs, da das Serummaterial während der Untersuchungsreihe ab und zu teilweise hatte erneuert werden müssen, individuelle Verschiedenheiten störend gewirkt hatten.[1]) Um beide Fehlerquellen zu vermeiden, mufste ich erstens von Anfang an von jedem Tiere ein Quantum Serum besitzen, das für die ganze Versuchsreihe ausreichte. Bei den grofsen Tieren war das leicht zu erreichen, bei den kleinen Tieren — Meerschweinchen und Kaninchen —, die sehr wenig Blut liefern, wurde das Serum mehreren Tieren entnommen und gemischt. Das Quantum Meerschweinchenserum, das ich so erhielt, reichte leider, da ich das nötige Tiermaterial nicht gleich zur Hand hatte, doch nicht völlig aus, auch das Kaninchenserum mufste einmal gewechselt werden, da ich aus Versehen ein Tier verwendet hatte, das früher gegen Typhus abdominalis immunisiert worden war. Andere Störungen kamen in dieser zweiten Versuchsreihe nicht vor, und da es mir gelang, mit den 10 Sera 13 verschiedene Bakterienarten in ca. 8 Tagen zu untersuchen, wurde auch die zweite Fehlerquelle — das Schwächerwerden der Sera bei längerem Stehen — vermieden. Ich untersuchte die Bakterien der Cholera, des Vibrio Metschnikoff, des Typhus abdominalis, Paratyphus B, Koli, Proteus, Staphylococcus aureus und Pyocyaneus nochmals, ferner zwei andere Dysenteriestämme (Flexner und Shiga), Paratyphus A, Rotz und Alkaligenes.

1) Ich verweise hier auf die mir bei der Ausführung dieser Arbeit noch nicht bekannte, aus dem Neisserschen Laboratorium hervorgegangene Dissertation von Müller, die später noch Erwähnung finden wird.

Die Versuchsanordnung war sonst die gleiche. Die Resultate waren die folgenden:

Versuchsreihe II.

Cholera.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	+	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	+	—	—	—	-	—	—	—
Kaninchen	+	—	—	—	—	—	—	—
Hund	+	—	—	—	—	—	—	—
Gans	+	+	+	+	—	—	—	—
Huhn	+	+	+	—	—	—	—	—
Hammel	×	=	=	=	—	—	—	—
Ziege	×	×	×	×	=	—	—	—
Pferd	×	×	×	=	+	+		—
Rind	×	×	×	×	=	+	—	—

Vibrio Metschnikoff.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	+?	—	—	—	—	—	—	—
Hund	+	+	—	—	—	—	—	—
Gans	+	—	—	—	—	—	—	—
Huhn	+	—	—	-	—	—	—	—
Hammel	=	+	—	-	-	—	—	—
Ziege	×	×	×	+	—	—	—	—
Pferd	×	×	×	+	+	—	—	—
Rind	×	×	×	+	+	—	—	—

Typhus abdominalis.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	=	+	+	—	—	—	—	—
Mensch	=	+	+	—	—	—	—	—
Kaninchen	×	=	+	—	—	—	—	—
Hund	×	×	—	—	—	—	—	—
Gans	×	×	×	—	—	—	—	—
Huhn	×	×	—	—	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	×	×	—	—	—
Ziege	×	×	×	×	×		—	—
Pferd	×	×	×	×	=	+	—	—
Rind	×	×	×	×	×	=	—	—

Paratyphus A.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	+?	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	+	—	—	—	—	—	—	—
Hund	+	+	+	—	—	—	—	—
Gans	=	+	+	—	—	—	—	—
Huhn	=	+	+	—	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	×	×	×	×	—
Ziege	×	×	×	×	—	—	—	—
Pferd	×	×	×	=	+	—	—	—
Rind	×	×	×	=	+	—	—	—

Paratyphus B.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	—	—	—	—	—	—	—	—
Hund	—	—	—	—	—	—	—	—
Gans	—	—	—	—	—	—	—	—
Huhn	—	—	—	—	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	+	—	—	—	—
Ziege	×	×	×	+	—	—	—	—
Pferd	×	×	=	=	—	—	—	—
Rind	×	×	×	=	—	—	—	—

Koli.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	+	+	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	=	=	+	—	—	—	—	—
Hund	+	+	—	—	—	—	—	—
Gans	+	+	=	+	—	—	—	—
Huhn	+	+	=	+	—	—	—	—
Hammel	=	=	×	×	=	—	—	—
Ziege	+	=	×	×	×	×	=	+
Pferd	=	×	×	×	×	×	×	+
Rind	+	+	+	×	×	×	×	=

Dysenterie Shiga.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	×	=	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	×	=	—	—	—	—	—	—
Hund	×	×	×	+	—	—	—	—
Gans	×	×	×	×	=	—	—	—
Huhn	×	×	×	=	—	—	—	—
Hammel	=	×	×	=	+	—	—	—
Ziege	×	×	×	×	+	—	—	—
Pferd	×	×	×	=	+	—	—	—
Rind	×	×	×	×	=	+	—	—

Dysenterie Flexner.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	×	×	×	—	-	—	—	—
Mensch	×	×	×	=	—	—	—	—
Kaninchen	×	×	×	×	=	—	—	—
Hund	×	×	×	=	—	—	—	—
Gans	=	×	×	×	×	=	—	—
Huhn	—	×	×	×	×	=	—	—
Hammel	×	×	×	×	×	×	=	—
Ziege	=	×	×	×	×	×	×	×
Pferd	=	×	×	×	×	×	×	×
Rind	—	=	×	×	×	×	×	×

Rotz.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	—	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	×	=	—	—	—	—	—	—
Hund	=	—	—	—	—	—	—	—
Gans	=	+	+	—	—	—	—	—
Huhn	=	+	+	—	—	—	—	—
Hammel	×	×	=	=	—	—	—	—
Ziege	×	×	×	×	—	=	—	—
Pferd	×	×	×	-		+	—	—
Rind	×	×	×	×	=	+	—	—

Proteus.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	×	×	=	—	—	—	—	—
Kaninchen	+	+	—	—	—	—	—	—
Hund	×	×	×	×	—	—	—	—
Gans	×	=	+	—	—	—	—	—
Huhn	=	+	+	—	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	×	—	—	—	—
Ziege	×	×	×	×	+	—	—	—
Pferd	×	×	×	×	×	+	—	—
Rind	×	×	×	×	×	×	—	—

Alcaligenes.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	=	=	?	—	—	—	—	—
Kaninchen	×	×	+	—	—	—	—	—
Hund	×	=	+	—	—	—	—	—
Gans	×	=	+	—	—	—	—	—
Huhn	×	=	+	—	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	×	?	—	—	—
Ziege	×	×	×	×	?	—	—	—
Pferd	×	×	×	=	=	—	—	—
Rind	×	×	×	×	×	×	—	—

Staphylococcus.

Verdünnungen	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{16}$	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	$^1/_{128}$
Meerschweinchen . . .	—	—	=	—	—	—	—	—
Mensch	+?	—	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	=	=	=	+	—	—	—	—
Hund	—	+?	=	=	—	—	—	—
Gans	=	=	+	+	+	—	—	—
Huhn	—	=	=	+	+	—	—	—
Hammel	=	=	×	=	=	=	—	—
Ziege	=	=	=	×	=	=	—	—
Pferd	—	=	=	×	×	×	=	—
Rind	—	=	=	×	×	×	=	=

Pyocyaneus.

Verdünnungen	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meerschweinchen . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Mensch	=	?	—	—	—	—	—	—
Kaninchen	×	×	—	—	—	—	—	—
Hund	=	=	+	—	—	—	—	—
Gans	×	×	+	+	—	—	—	—
Huhn	=	+	—	—	—	—	—	—
Hammel	×	×	×	+	+	—	—	—
Ziege	×	×	×	×	×	×	—	—
Pferd	×	×	×	×	×	×	—	—
Rind	×	×	×	×	×	×	—	—

Wie ich gehofft hatte, haben sich die Abweichungen von dem schon in der ersten Serie deutlich zutage getretenen Gesetz in dieser zweiten Untersuchungsreihe, in der teils wegen der durch gröfsere Übung erzielten Sicherheit im Arbeiten, teils durch Vermeiden der genannten Fehlerquellen regelmäfsigere Versuchsbedingungen geschaffen waren, bedeutend vermindert, gänzlich beseitigt wurden sie allerdings nicht, und bei der Untersuchung von biologischen Vorgängen ist das auch nicht zu erwarten.

Die neu untersuchten Bakterien (Dysenterie Shiga und Flexner, Paratyphus A, Rotz und Alkaligenes) wurden in der nämlichen Stärkereihenfolge von den verschiedenen Sera agglutiniert wie die anderen früher schon untersuchten Bakterien.

Im übrigen wurden die Resultate der ersten Reihe im allgemeinen bestätigt. Vibrio Cholera wurde etwas stärker von Gänseserum agglutiniert als von Hühnerserum, Vibrio Metschnikoff etwas mehr von Hundeserum als von Gänseserum, im gleichen Sinne waren bei

Dysent. Flexner das Verhältnis von Kaninchen = zu Hundeserum,

bei Typhus abd. das Verhältnis von Gänse = zu Hühnerserum,

bei Paratyphus A das Verhältnis vom Hammel = zu Ziegen-, Pferde- und Rinderserum,

bei Koli das Verhältnis von Kaninchen = zu Menschenserum,

bei Proteus das Verhältnis von Menschen = zu Kaninchenserum,

und das Verhältnis von Hunde = zu Gänse- und Hühnerserum

verschoben.

Die Abweichungen von der Regel zeigten sich also immer nur bei den Sera, deren Agglutinations-Titer ohnehin nicht stark voneinander abwichen. Es kam z. B. nie vor, dafs Meerschweinchen etwa ausnahmsweise mehr agglutiniert als Gans und Huhn oder gar als Rind und Pferd. Den einzigen gröfseren, aber wie sich später herausstellte, nur scheinbaren Ausnahmen begegnete ich, als ich den Typhusbazillus untersuchte und dabei konstatierte, dafs das Kaninchenserum mehr als irgendein anderes Serum agglutiniert hatte. Es erwies sich dann aber mit Sicherheit, dafs, wie oben angeführt, aus Versehen das Blut eines früher gegen Typhus immunisierten Kaninchens verwendet worden war.[1]) Ich habe dieses Ergebnis daher mit Recht aus der Versuchsreihe ausgeschaltet und den Versuch mit dem Serum eines nicht immunisierten Tieres wiederholt, das zu erwartende Resultat erhalten und dieses in die Tabelle eingetragen.

Die Erscheinung der Hemmung wurde in geringem Grade bei Bac. Coli, bei Staphylococcus aureus und bei Dysenterie Flexner beobachtet. So aufserordentlich starke Hemmungszonen, wie bei den ersten von mir untersuchten Dysenteriestämmen fanden sich nicht wieder.

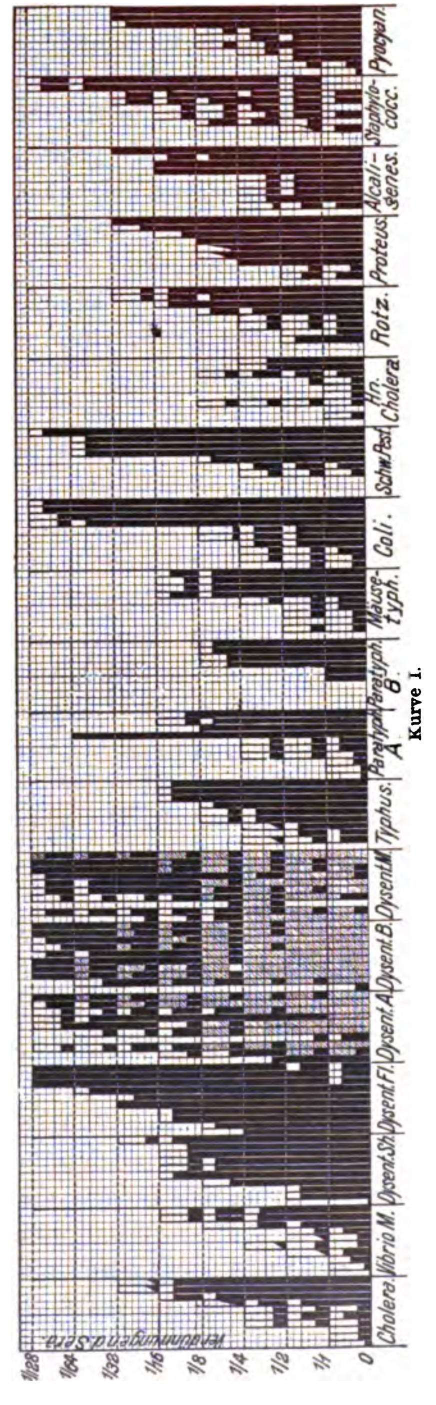
Es steht also fest, dafs die 10 von mir untersuchten Sera ihrer normalen Agglutinationsfähigkeit nach in eine Reihenfolge geordnet werden können, die für alle 19 verwendeten Bakterienarten die gleiche ist. Am stärksten agglutiniert jedesmal Rinderserum, dann folgen, nach absteigender Wirkung geordnet, Pferde-,

1) Dieses Serum agglutinierte gleichzeitig auch Koli ziemlich stark, bekanntlich wird die Frage, ob Typhusimmunserum auch die Kolibazillen regelmäfsig agglutiniert, noch diskutiert.

Ziegen-, Hammel-, Hühner-, Gänse-, Hunde-, Kaninchen-, Menschen- und Meerschweinchenserum. Die einen Bakterienarten werden leicht, die andern weniger leicht agglutiniert, aber die Reihenfolge der Sera bleibt immer die gleiche. Bei der relativ grofsen Zahl der Sera und Bakterien, die zur Untersuchung gelangten, dürfte es wohl berechtigt sein, dieses Gesetz vorläufig auch auf alle übrigen Sera und Bakterienarten auszudehnen.

Im weiteren folgt aus meinen Ergebnissen, dafs sich die untersuchten Sera ihrem Agglutinationsvermögen nach in einzelne Gruppen einteilen lassen. Die Agglutinationstiter von Meerschweinchen und Kaninchen, von Gans und Huhn, sowie von Hammel, Ziege, Pferd und Rind liegen einander immer sehr nahe, und die Unterschiede in der Agglutinationskraft der einzelnen Gruppenglieder sind viel geringer als die Unterschiede, die man zwischen den verschiedenen Gruppen wahrnehmen kann. Verwandte Tiere haben also ein ähnliches Agglutinationsvermögen. Das Verhalten von Menschen- und von Hundeserum läfst sich natürlich für diese Betrachtungen, die zu einer Ausdehnung meiner Versuche auf andere Tierspezies anregen, vorderhand nicht verwerten. Ob die Art der Nahrung bei der Entwicklung der Normalagglutinine eine Rolle spielt, oder ob die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Tierklasse ein ähnliches Verhalten auch in dieser Hinsicht bedingt, das sind einige Fragen, die noch zu entscheiden wären.

Ich habe die Ergebnisse der ersten und der zweiten Versuchsreihe sowie der Nachprüfungen, so gut es bei dem nicht vollkommen gleichartigen Material ging, zusammengezogen und in den nachfolgenden graphischen Darstellungen anschaulich wiederzugeben gesucht. Diese Kurven können natürlich, da die einzelnen Werte in den verschiedenen Untersuchungsserien nicht genau übereinstimmen, wenn auch das allgemeine Resultat dasselbe ist, und da Mittelwerte wegen der drei verschiedenen Grade der Agglutination, die nicht in einem rein mathematischen Verhältnisse zueinander stehen, nicht durch einfache Addition und Division erhalten werden können, nicht als eine absolut genaue Wiedergabe meiner Resultate angesehen



Kurve I.

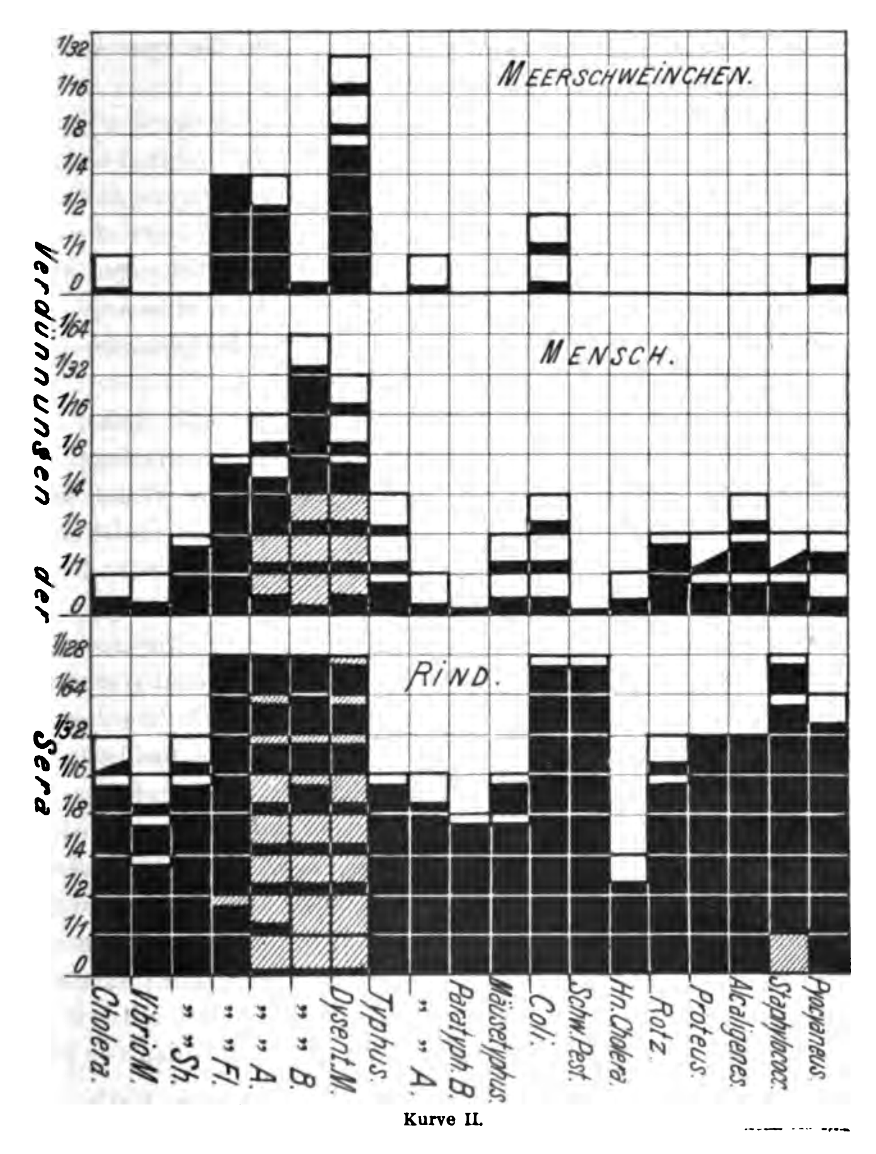
werden. In dieser Hinsicht sind die direkten Versuchsergebnisse natürlich vorzuziehen, wohl aber gewähren diese Darstellungen einen raschen Überblick über die hauptsächlichsten Ergebnisse meiner Arbeit und eine klarere Auffassung der Hauptpunkte.

Die verschiedenen Verdünnungen der Sera sind in der Ordinate verzeichnet. Die Agglutination ist in Form eines Rechteckes angegeben, die drei Grade der Agglutination, die in den Tabellen mit +, = und × bezeichnet sind, werden durch Drittel-, Halb- und Ganzschattierung dieser rechteckigen Felder die Hemmungszonen durch einen helleren Farbenton dargestellt.

Auf Tafel I, die eine Wiedergabe meiner sämtlichen Resultate enthält, sind die Agglutinationen der 19 von mir untersuchten Bakterienarten durch die 10 Sera hintereinander geordnet. Die Reihenfolge der Sera ist oben angegeben[1]), sie ist für jedes Bakterium dieselbe. Alles andere ist ohne weiteres aus der Kurve ersichtlich.

1) Sie entspricht der Reihenfolge in den Tabellen vom Meerschweinchen aufsteigend zu Rind.

In der zweiten Kurve sind die für Meerschweinchen-, für Menschen- und für Rinderserum mit den 19 Bakterien erhaltenen



Kurve II.

Werte untereinander geordnet. Die Resultate, die ich mit den übrigen Sera erhielt, habe ich hier nicht wiedergegeben, da ich glaube, dafs dieser kleine Auszug aus meinen Ergebnissen in

Verbindung mit der ersten Kurve, die eine anschauliche Darstellung aller Resultate bildet, genügen dürfte, um das von mir gefundene Gesetz der Normalagglutination klar zu erkennen. Die Kurve II ist im übrigen ähnlich hergestellt wie die erste Kurve und bedarf keiner weiteren Erläuterung.

Aus beiden Kurven geht mit aller wünschenswerten Deutlichkeit hervor, dafs es sich wirklich um ein Gesetz handelt, das nur wenige Ausnahmen hat. Hätte ich für diese graphischen Darstellungen lediglich die zweite, von Versuchsfehlern freiere Untersuchungsreihe benutzt, so wären die Abweichungen von der Regel noch unbedeutendere gewesen, und es unterliegt für mich keinem Zweifel, dafs sie bei noch weiter fortgesetzten Experimenten beinahe völlig verschwinden würden.

Wie ich schon in der Einleitung kurz bemerkt habe, ist eine solche systematische Untersuchung der Normalagglutination verschiedener Bakterien durch die gleiche Reihe von Tiersera noch niemals vorgenommen worden, dagegen findet sich in der Literatur eine grofse Anzahl vereinzelter Angaben, deren hauptsächlichste Resultate in Paltaufs bekannter Monographie über die Agglutination[1]) zusammengefafst sind. Die meisten Arbeiten auf diesem Gebiete sind von ganz anderen Gesichtspunkten aus unternommen worden und ihre Ergebnisse lassen sich schon aus diesem Grunde nicht recht mit den meinen vergleichen, so hauptsächlich die Arbeit von Löwit und Schwarz[2]), aber auch die später genau anzuführenden Arbeiten von Goldberg sowie von Posselt und v. Sagasser. Aber auch wenn man die dadurch bedingten Unterschiede in Abrechnung bringt, befinden sich meine Resultate mit den von anderen Autoren erhaltenen zum Teil in direktem Widerspruch. So lassen sich die Befunde, die Gengou[3]) über die Agglutination des Milzbrandbazillus durch verschiedene Normalsera angibt, mit den von mir

1) Paltauf, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (Kolle und Wassermann) IV, 645 ff.

2) Löwit und Schwarz, Über Bakterizidie und Agglutination im Normalblute. Zeitschr. f. Heilkunde, 1903, 24, 8.

3) Gengou, Étude sur les rapports entre les agglutinines et les lysines dans le charbon. Ann. Pasteur, 1899, 13., 642.

mit 19 anderen Bakterienarten erhaltenen nicht in Übereinstimmung bringen. Nach seinen Angaben agglutinieren Tauben- und Mäuseserum den Milzbrandbazillus gewöhnlich gar nicht, Rattenserum agglutiniert ihn wenig, durchschnittlich in der Verdünnung von 1 : 10, Pferdeserum bei 1 : 30, Ziegenserum bei 1 : 40, Meerschweinchenserum ebenso, Hundeserum bei 1 : 100, Rinderserum bei 1 : 20 und Menschenserum hier und da noch bei einer Verdünnung von 1 : 500. Man mufs also annehmen, dafs die von mir für die Agglutination von 19 verschiedenen Bakterienarten aufgestellte Serumreihenfolge für den Milzbrandbazillus eine andere ist, oder dafs die Beobachtungen von Gengou aus irgendeinem Grunde nicht vollkommen richtig waren. Aber auch was die Normalagglutination von den Bakterienarten betrifft, die ich ebenfalls untersucht hatte, finden sich in der Literatur ganz abweichende Angaben. So soll normales Pferdeserum den Cholerabazillus, Kaninchenserum den Typhusbazillus nicht agglutinieren[1]), nach Jalta[2]) agglutiniert normales Kaninchenserum den Typhusbazillus noch in einer Verdünnung von 1 : 30, Schafserum aber agglutiniert ihn nicht, nach Posselt und Sagasser[3]) wird der Typhusbazillus vom Kaninchenserum stärker als vom Hühnerserum, vom Ziegenserum jedoch gar nicht agglutiniert, ebenso wirkt das letztgenannte Serum nach diesen Autoren kaum auf den Kolibazillus, den Kaninchenserum hauptsächlich aber Hühnerserum stark agglutiniert, und nach Nicolle und Trenell[4]) zeigt Kaninchenserum überhaupt keine Normalagglutination. Neben diesen, von den meinen aber auch unter sich stark abweichenden Resultaten treffen wir allerdings auch auf übereinstimmende, hauptsächlich finden beinahe alle Autoren immer das Meerschweinchenserum als das am

---

1) Siehe u. a. Kraus und Löw, Über Agglutinine. Wien. klin. Wochenschrift, 1899, Nr. 5.

2) Jalta, Experimentelle Untersuchungen über die Agglutination der Typhusbazillen etc. Zeitschr. f. Hygiene, 1900, 33.

3) Posselt und v. Sagasser, Über Beeinflussung der Agglutinine durch spez. Absorptionen. Wiener klin. Wochenschr., 1903, 24.

4) Nicolle und Trenell, Recherches sur le phénomène de l'agglutination. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1902, 16, 562.

wenigsten wirksame.[1]) Nach Hetsch und Lentz[2]) sind choleraähnliche Vibrionen durch Pferdeserum agglutinierbar und Kolle[3]) hat sogar für die Normalagglutination des Choleravibrio eine Serumreihe aufgestellt, die von der meinen wenig abweicht. Ziegen- und Pferdeserum agglutinierten auch bei seinen Versuchen stärker als Kaninchenserum. Nach diesen unter sich sehr abweichenden Angaben, wie auch nach den Untersuchungen von Kraus[4]), Bordet[5]) und andern und nach der neuerdings erschienenen, schon erwähnten Arbeit Müllers[6]) scheinen die individuellen Agglutinationsverschiedenheiten bei der gleichen Tierspezies sehr grofs zu sein. Es kann sein, dafs ich namentlich deshalb so übereinstimmende Resultate bekam, weil ich für die Agglutination der verschiedenen Bakterien, soweit es anging, stets nur das Serum eines einzigen Individuums pro Tierspezies angewendet habe. Individuelle Unterschiede habe ich auch konstatieren können, allerdings waren diese niemals so grofs, dafs sie meine Ergebnisse wesentlich hätten beeinflussen können. Die Unterschiede meiner Resultate von denjenigen anderer Autoren sind also durch dieses Moment nicht völlig erklärt, doch dürften die Ergebnisse einer Arbeit, die sich eingehender als irgendeine andere mit dieser einen Frage beschäftigt hat, überzeugendere sein. Meine Untersuchungen werden noch fortgesetzt und auf andere Sera und Bakterien ausgedehnt werden, und ich zweifle nicht daran, dafs die für die bisher untersuchten Normalagglutinationen gültige Gesetzmäfsigkeit sich im allgemeinen bestätigen wird.

Die theoretische Bedeutung dieses eigentümlich regelmäfsigen Verhaltens der Sera gegen die verschiedensten zum Teil (Alkaligenes) nicht einmal pathogenen Bakterien werde ich erst später

---

1) Posselt u. v. Sagasser, a. a. O. Goldberg, Die Agglutinations reaktion bei Infektionen etc. Zentralblatt f. Bakteriologie, 1901, 30. 605.

2) Hetsch und Lentz, Beiträge etc. Festschrift f. Koch, 1904, 17.

3) Kolle, Über den jetzigen Stand der Choleradiagnose. Klin. Jahrbuch, 1903, 11.

4) a. a. O.

5) a. a. O.

6) Müller Georg, Über Agglutinine norm. Tiersera. Inaug.-Diss. 1907.

eingehend besprechen, weil ich hier noch eine Anzahl Versuche einzuschalten habe, die für die Auffassung der erwähnten Erscheinung nicht gleichgültig sind. Verschiedene Forscher haben seit längerer Zeit darauf aufmerksam gemacht, dafs einige chemische Eigentümlichkeiten der Immunstoffe in dem allgemeinen Verhalten kolloidal gelöster Stoffe ein Analogon und damit vielleicht auch ihre Erklärung finden. Seit Bordet[1]) nachgewiesen hat, dafs die Bakterien in salzfreier Lösung nicht agglutiniert werden, ist die Agglutination oft mit dem Aussalzen kolloidaler Stoffe aus ihrem Lösungsmittel verglichen worden. Dafs diese zwei Vorgänge nicht gleichwertig sind, ist allerdings klar, anderseits geht namentlich aus den Untersuchungen von Neisser und Friedemann[2]) und [3]) deutlich hervor, dafs die zweite Phase der Agglutination von Bakterien und das Ausflocken einer kolloidalen Lösung unter ähnlichen, ja zum Teil analogen Bedingungen zustande kommen. Es lag daher nahe, die ausflockende Wirkung der 10 verschiedenen Sera auf kolloidale Lösungen zu prüfen und zu sehen, ob sich hier vielleicht die gleiche Reihenfolge wie bei der Agglutination beobachten liefs.

Nach einigen Vorversuchen mit andern kolloidalen Lösungen, die sich als nicht geeignet für meine Zwecke erwiesen, habe ich, ausgehend von den Arbeiten Neissers und Friedemanns, ausschliefslich Mastixsuspensionen verwendet.

Nachdem ich etwas Mastixharz in ganz wenig Alkohol gelöst, die Lösung in destilliertes Wasser gegossen und das Ganze filtriert hatte, bestimmte ich durch Verwendung absteigender Quantitäten die Menge Kochsalz, die der Mastixsuspension zugesetzt, gerade nicht mehr genügt, eine Fällung zu erzeugen. Die vielen Vorversuche, die eigentlich nur dazu dienten, gewisse Täuschungen unmöglich zu machen, will ich hier nicht anführen. Ich habe

---

1) Bordet, Le mécanismne de l'agglutination. Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. 13, S. 225 ff.

2) Neisser und Friedemann, Studien über Ausflockungserscheinungen. Münchener med. Wochenschr., 1903, 11.

3) Derselbe, Studien über Ausflockungserscheinungen II. Dieselbe Zeitschrift 1904, Nr. 19.

schliefslich jedem Gläschen 0,25 ccm einer 3,75 proz. Na Cl-Lösung zugesetzt. Ein geringes Plus an Na-Cl-Lösung verursachte Fällung. Bei einer anderen Reihe verwendete ich 0,2 ccm. In einem Punkte allerdings mufsten sich diese Experimente grundsätzlich von den Agglutinationsversuchen unterscheiden. Die Sera konnten der mit Kochsalz versetzten Mastixsuspension nur in kolossalen Verdünnungen zugesetzt werden, da oberhalb solcher Verdünnungen, die durchschnittlich mit 1 : 1000 begannen und bis auf 1 : 100 und 300 Millionen hinuntergingen, die Ausflockung gehemmt wird.

Auch durften die Sera nicht mit physiologischer Kochsalzlösung sondern nur mit destilliertem Wasser verdünnt werden, da ein weiterer Salzzusatz zu der Mastixsuspension sogleich Ausflockung herbeigeführt hätte.

Um die Sera chemisch nicht zu sehr zu verändern, wurden sie allerdings zuerst auf den zehnten Teil durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, von da ab aber nur mit destilliertem Wasser. Da die Sera niemals in einer Verdünnung, die weniger als 1 : 500 und selten in einer Verdünnung, die weniger als 1 : 1000 betrug, zur Verwendung kamen und die Ausflockungen gewöhnlich erst von der Verdünnung 1 : 3000 an begannen, konnte das minimale Plus an Kochsalz, das durch den Serumzusatz der Mastixsuspension erzielt wurde, nicht in Betracht kommen. Auf 1 ccm der Mastixsuspension kam immer 1 ccm der Serumlösung. Welche Verdünnungen ich anwendete, wird man am besten aus den Tabellen ersehen, und ich werde auf diesen Punkt später auch noch zu sprechen kommen.

Die Versuchsgläschen wurden ebenfalls 2 Stunden in den Brutschrank gestellt, dann bei Zimmertemperatur bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurden die Resultate aufgeschrieben. Längeres Stehenlassen änderte sie kaum.

Die vielen Vorversuche, die nötig waren, um verschiedene Versuchsfehler sicher zu vermeiden und mich über die notwendigen Verdünnungen zu orientiren, und die zum Teil schon ganz brauchbare Resultate lieferten, lasse ich hier weg.

Ich habe schliefslich, als ich die Experimente genügend vorbereitet hatte, die folgenden Resultate erhalten:

Tabelle I.

Salzzusatz 0,25 der 3,75proz. Na Cl-Lösung.

Verdünnung des Serums	Meerschweinchen	Kaninchen	Hund	Huhn	Hammel	Ziege	Pferd	Rind
1 : 500	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 1 000	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 3 000	—	—	—	=	×	+	—	=
1 : 10 000	—	×	×	+	×	×	×	×
1 : 30 000	+?	=	×	×	×	×	×	=
1 : 100 000	—	+	+	+	=	+	=	=
1 : 300 000	—	×	+	—	+	×	=	+
1 : 1 000 000	—	+?	+	—	=	+	=	+
1 : 3 000 000	—	—	—?	—	=	+	=	—
1 : 10 000 000	—	—	—	—	-	×	=	—

Ich habe zu diesen Versuchen sowie auch zu den nächsten im allgemeinen inaktive Sera benutzt, ich erwähne übrigens, dafs sowohl in dieser Versuchsreihe als auch in den zwei nachfolgenden (Tabelle II und III) noch einige Versuchsfehler störend gewirkt haben, doch halte ich mich nicht für berechtigt, diese Serien deshalb auszuschliefsen.

Ein Nachversuch mit aktivem Ziegenserum ergab folgendes Resultat:

Verdünnung	1 : 500	—
»	1 : 1 000	—
»	1 : 3 000	—
»	1 : 10 000	×
»	1 : 30 000	×
»	1 : 100 000	×
»	1 : 300 000	×
»	1 : 1 000 000	×
»	1 : 3 000 000	=
»	1 : 10 000 000	=

Tabelle II.

(Zusatz 0,25) Verhältnisse auch sonst wie bei 1.

Verdünnung des Serums	Meerschweinchen	Kaninchen	Hund	Huhn	Hammel	Ziege	Pferd	Rind
1:3 000	—	—	—	+	—	—	—	×
1:10 000	—	—	+	+	—	—	×	×
1:30 000	—	×	-	=	×	=	×	=
1:100 000	—	×	=	—	×	×	×	+
1:300 000	—	×	—	—	×	×	=	—
1:1 000 000	—	—	—	—	×	×	=	—
1:3 000 000	—	—	—	—	+	×	—	—
1:10 000 000	—	—	—	--	—	×	+	—
1:30 000 000	—	—	—	—	—	+	—	—
1:100 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—
1:300 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle III.

Zusatz 0,2, sonst wie 1 und 2.

Verdünnung des Serums	Meerschweinchen	Kaninchen	Hund	Huhn	Hammel	Ziege	Pferd	Rind
1:3 000	—	—	—	—	—	—	—	=
1:10 000	—	—	+	-	—	—	×	×
1:30 000	—	×	+	—	=	—	×	×
1:100 000	—	+	+	—	=	—	=	+
1:300 000	—	—	—	—	—	—	—	—
1:1 000 000	—	—	—	—	—	—	--	—
1:3 000 000	—	—	—	—	—	=	—	—
1:10 000 000	—	—	—	—	—	=	—	—
1:30 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—
1:100 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—
1:300 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—

Die Resultate, die ich mit dem geringeren Salzzusatz erhielt, waren bedeutend weniger günstig, die Fällung durch Rinderserum war allerdings die gleiche geblieben, dagegen war die Ausflockung des Mastix durch die anderen Sera bedeutend zurückgegangen und daher weniger gut zu vergleichenden Betrachtungen geeignet. Ich machte nun zunächst einige Nachprüfungen, um zu sehen, ob dieser durch verschiedenen Salzzusatz bedingte Unterschied ein konstanter sei, oder ob man vielleicht bei Ver-

wendung ganz frischen und aktiven Serums andere Resultate bekomme. Da Ziegen- und Hammelserum bei Zusatz von 0,2 der genannten Salzlösung auffallend wenig gefällt hatte, benutzte ich diese zwei Sera, um mir über diesen Punkt Klarheit zu verschaffen.

Verdünnung	Ziegenserum (alt) Zusatz 0,2	Ziegenser. (frisch) Zusatz 0,25	Ziegenser. (frisch) Zusatz 0,2	Hammelser. (frisch) Zusatz 0,25	Hammelser. (frisch) Zusatz 0,2
1 : 3 000	−	−	−	−	−
1 : 10 000	−	−	−	−	−
1 : 30 000	−	−	−	×	+
1 : 100 000	−	−	−	×	+
1 : 300 000	−	+	−	×	×
1 : 1 000 000	−	+	−	×	−
1 : 3 000 000	=	×	×	=	+
1 : 10 000 000	=	×	×	=	−
1 : 30 000 000	+	×	×	−	−
1 : 100 000 000	−	−	+	−	−
1 : 300 000 000	−	−	−	−	−

Wenn man in dieser Tabelle die mit altem und inaktiviertem Hammelserum und gleichzeitigem Zusatz von 0,2 (Tabelle 3) sowie die mit altem Ziegen- und Hammelserum bei Zusatz von 0,25 erhaltenen Werte (Tabelle I und II) aufnimmt, dann bekommt man — ohne einen absolut sicheren Beweis dafür zu haben — den Eindruck, dafs es besser ist, frisches aktives Serum für diese Untersuchungen zu benutzen, und man sieht, dafs ein Zusatz von 0,25 der Salzlösung jedenfalls besser vergleichbare Resultate liefert als eine von 0,2 ccm. Ich nahm mir daher vor, eine letzte Versuchsreihe mit lauter frischen, aktiven Sera und mit einem für alle Gläschen gleichbleibenden Zusatz von 0,25 ccm einer 3,75 proz. NaCl-Lösung vorzunehmen.

Bevor ich jedoch diese neue Versuchsreihe ansetzte, wollte ich noch sehen, ob man ev. bei Anwendung von noch zahlreicheren, näher aneinander gerückten Verdünnungen feinere Unterschiede in der Wirksamkeit der verschiedenen Sera, die der Beobachtung wegen der zu weit auseinanderliegenden Serum-

konzentrationen entgangen sein konnten, wahrnehmen könne. Die sehr ausgedehnten Versuche, die ich nach dieser Richtung hin vornahm, will ich hier nicht wiedergeben, da sie kein unzweideutiges Resultat ergaben. Sie sprachen eher dafür, dafs die von mir gewählten Verdünnungen die richtigen waren, es ist aber nicht ausgeschlossen, dafs man durch Anwendung von noch zahlreicheren Verdünnungen wenigstens in einigen Punkten doch besseren Aufschlufs erlangen würde.

Die letzten Resultate, welche ich nun unter ausschliefslicher Verwendung von frischen, aktiven Sera und konstantem Zusatz von 0,25 ccm eine 3,75 proz. NaCl-Lösung pro Versuchsröhrchen erhielt, sind in den Tabellen IV und V wiedergegeben.

Tabelle IV.

Verdünnung des Serums	Meerschweinchen	Mensch	Kaninchen	Hund	Huhn	Gans	Hammel	Ziege	Pferd	Rind
1 : 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 300	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 1 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 3 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 10 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 30 000	+?	—	—	—	—	—	—	+	+	—
1 : 100 000	—	—	—	—	—	—	=	+	=	×
1 : 300 000	—	—	—	—	—	—	=	×	×	×
1 : 1 000 000	—	—	—	—	—	—	×	+	×	×
1 : 3 000 000	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+
1 : 10 000 000	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
1 : 30 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 100 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 300 000 000	—	—	—	—	—	—	—	=	—	—

Wenn man diese fünf Tabellen untereinander vergleicht, so fällt sogleich eine gewisse Inkonstanz der Resultate auf, die jedenfalls nicht nur auf Versuchsfehler, wie sie bei Anwendung so

Tabelle V.

Verdünnung des Serums	Meer-schwein-chen	Mensch	Kaninchen	Hund	Huhn	Gans	Hammel	Ziege	Pferd	Rind
1 : 1 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 3 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 10 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 30 000	—	—	—	+	—	+	—	—	—	=
1 : 100 000	—	—	—	+	+	—	—	—	=	=
1 : 300 000	+?	—	—	—	—	—	+	—	=	×
1 : 1 000 000	—	—	—	—	—	—	+	+	=	=
1 : 3 000 000	—	—	—	—	—	—	+	+	×	+
1 : 10 000 000	—	—	—	—	—	—	+	+	×	=
1 : 30 000 000	—	—	—	—	—	—	—	+	+	=
1 : 100 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 300 000 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

vieler und so grofser Verdünnungen ja leicht vorkommen können, zurückzuführen sind. Die Tatsache, dafs die gleichen Tiersera Mastixsuspensionen bei gleichem Salzzusatz oft in ganz verschiedenen Konzentrationen fällen, wäre wohl am einfachsten aus individuellen Verschiedenheiten zu erklären, und es scheint in der Tat, dafs solche Unterschiede bei der Fällung von Mastix noch deutlicher zutage treten als bei der Agglutination. So stimmen denn auch namentlich die Resultate, die ich mit alten, inaktivierten Sera bekam (Tabelle I und II) mit denjenigen der letzten zwei Tabellen, denen lauter Versuche mit frischen, aktiven Sera zugrunde liegen, untereinander schlecht überein, während die Ergebnisse in den Tabellen I und II und in den Tabellen IV und V nicht so weit auseinanderliegen. Immerhin ist die Übereinstimmung sogar in den Resultaten, die in den Tabellen IV und V wiedergegeben sind, und die mit ganz besonderer Sorgfalt und mit dem genau gleichen Material erworben worden sind, keine vollständige. Die Gründe für diese Abweichungen müssen jedenfalls in der Untersuchungsmethode gesucht werden. Leider war

in Anbetracht der sehr sorgfältigen Durchführung dieser Versuche und der gründlichen Vor- und Nachprüfungen, die ich hier, um nicht zu ermüden, nicht zahlenmäfsig wiedergebe, keine Aussicht vorhanden, durch Aufstellen weiterer Versuchsreihen die Resultate völlig zur Deckung zu bringen. Trotzdem darf ich aus den vorliegenden Ergebnissen wohl mit Recht schliefsen, dafs das von mir für die Agglutination von Bakteriensuspensionen aufgestellte Gesetz einer bestimmten Serumreihenfolge auch für die Ausflockung von Mastix gültig zu sein scheint. Ich kann freilich nicht so weit gehen, zu sagen, Mastix wird, wie eine jede Bakteriensuspension von den zehn von mir untersuchten Sera in der folgenden Stärkereihenfolge gefällt: Rind, Pferd, Ziege, Hammel, Huhn, Gans, Hund, Kaninchen, Mensch, Meerschweinchen; denn erstens bekam ich mit verschiedenen Sera gewöhnlich gar keine Ausflockung, so dafs sich schon aus diesem Grunde eine genaue Abstufung der Wirkung von Serum zu Serum gar nicht beobachten liefs, zweitens variieren die Resultate, die ich mit dem Serum der gleichen Tierspezies erhielt, hier und da ziemlich beträchtlich, so dafs sich auch das Wirkungsverhältnis der Glieder einer Gruppe unter sich verschiebt, und drittens ist es gerade bei diesen Versuchen aufserordentlich schwer, Hemmungen, die ja unzweifelhaft vorhanden sind, von einem Ausbleiben der Fällung aus Mangel an fällender Substanz zu unterscheiden, dies namentlich dann, wenn in der ganzen Reihe keine einzige Ausflockung aufgetreten ist. Mit absoluter Sicherheit läfst sich nur das eine sagen: Rind, Pferd, Ziege und Hammel bilden auch hier eine einheitliche Gruppe, die sich in ihrem Fällungsvermögen von allen anderen sieben untersuchten Tiergattungen grundsätzlich unterscheidet und allem Anschein nach — ich erinnere an das oben über die allfälligen Hemmungen Gesagte — Mastix am stärksten von allen Sera fällt. Jedenfalls zeichnet sich diese Gruppe durch eine ziemlich scharf umgrenzte charakteristische Fällungszone aus. Auch scheinen Rind und Pferd — namentlich wenn man die letzten zwei Tabellen ins Auge fafst — entschieden stärker zu fällen als Ziege und Hammel, sowie sie auch stärker agglutinieren. Im Gegensatz

dazu und in Übereinstimmung mit den Agglutinationsversuchen fällt Meerschweinchenserum Mastix am wenigsten. Eine sichere Fällung wurde in keinem Falle konstatiert. Die übrigen Sera halten sich in der Mitte zwischen diesen zwei Extremen, eine bestimmte Reihenfolge wage ich für sie nicht aufzustellen, namentlich weil die Sera von Gans und Huhn sich als relativ wenig wirksam erwiesen.

Eine vollständige Übereinstimmung mit den Agglutinationsversuchen liefs sich a priori gar nicht erwarten, da die Verhältnisse ja durchaus keine analogen waren. Um vollkommen gleichförmige Bedingungen zu haben, müfste man einen kolloidalen Stoff kennen, der, wie Bakteriensuspensionen, in physiologischer Kochsalzlösung durch Serum gefällt wird. Versuche, die wir in dieser Richtung unternahmen, mifsglückten leider. Es bleibt aber immerhin interessant, dafs die Stärkereihenfolge, in der Mastix durch Tiersera gefällt wird, mit der von mir für die Normalagglutination aufgestellten soweit übereinstimmt, als bei der Verschiedenheit der Versuchsbedingungen überhaupt erwartet werden konnte. Wenn man diese Übereinstimmung nicht als eine zufällige ansehen und, ohne einen Anhaltspunkt zu haben, annehmen will, verschiedene Ursachen führten hier zu einem ähnlichen Resultate, dann wird man sie bei einer zusammenfassenden Betrachtung meiner Agglutinationsergebnisse berücksichtigen müssen.

Das hauptsächlichste Resultat meiner Arbeit lautet also: die Bakterien werden normalerweise durch die verschiedenen Tiersera in einer immer gleichbleibenden Stärkereihenfolge agglutiniert und diese Reihenfolge gilt im allgemeinen auch für die Ausflockung von Mastix durch die gleichen Sera.

Dieses Resultat findet eine ungezwungene Erklärung nur unter der Annahme, dafs in jedem Serum eine einheitliche Substanz vorhanden ist, welche die Agglutination sämtlicher untersuchter Bakterienarten bewirkt und deren physikalische Beschaffenheit

und Menge den Agglutinationstiter des Serums bestimmt. Eine derartige Annahme befindet sich aber in Widerspruch mit den herrschenden Anschauungen über die normalen Agglutinine und mit experimentell festgestellten Tatsachen. Die Untersuchungen mittels der spezifischen Absorptionsmethode haben ergeben, dafs ein mit einer bestimmten Bakterien- oder Blutkörperchenspezies zusammengebrachtes Serum die Agglutinationsfähigkeit nur für diese eine Zellart verliert, während sie für alle anderen Zellarten quantitativ erhalten bleibt — besser gesagt, erhalten bleiben kann (Bordet, Malkof, Landsteiner), und man hat aus dieser Tatsache den Schlufs gezogen, dafs im Blutserum für jedes Bakterium oder Blutkörperchen ein besonderes Agglutinin vorhanden sei. Allerdings ist diese Erklärung, nicht die einzig mögliche, und Landsteiner hat auf Grund ähnlicher Anschauungen von Bordet die Vermutung geäufsert, dafs bei der »spezifischen Absorption« gar keine Absorption, sondern eine spezifische Beeinflussung des Serums stattfinde, die ihm die Fähigkeit, die benutzte Bakterienart zu agglutinieren, nimmt. Diese Anschauung fand jedoch in den von Landsteiner[1]) selbst ausgeführten Versuchen keine Stütze.

Die Annahme der Vielheit der normalen Antikörper ist nun für die gesamte Theorie der Immunitätserscheinungen von grundlegender Bedeutung. Bekanntlich geht die Ehrlichsche Seitenkettentheorie von dem Gedanken aus, dafs die durch Immunisierung enstandenen Antikörper bereits in den Zellen des Organismus präformiert sind und auf den Reiz der Immunisierung nur in vermehrtem Mafse gebildet werden.

Die aus den Ergebnissen der spezifischen Absorptionsmethode abgeleitete Vielheit der normalen Antikörper ist stets mit Recht als eine der besten Stützen dieser Theorie angesehen worden.

---

1) Landsteiner, Über Serumagglutinine. Münchener med. Wochenschrift, 1902, S. 1950 ff.

Da wir vorläufig keinen Grund haben, an der Richtigkeit der mit der spezifischen Absorptionsmethode erhaltenen Resultate zu zweifeln, will ich versuchen, die von mir festgestellten Tatsachen mit den herrschenden Anschauungen in Einklang zu bringen.

Wenn wir annehmen, dafs das Serum für jedes Bakterium ein besonderes Agglutinin besitzt, dann folgt aus meinen Beobachtungen, dafs diese verschiedenen Agglutinine im Blute in ganz bestimmten, bei jeder Tierart wiederkehrenden Mengenverhältnissen zueinander stehen müssen, ferner, dafs die Zellen einzelner Tierarten eine viel höhere Fähigkeit der Gesamtagglutininproduktion haben als die Zellen anderer Spezies. Diese Annahmen haben schon an sich etwas Gezwungenes, werden aber ganz unwahrscheinlich durch meine Beobachtungen an Mastixsuspensionen, deren Ausflockung durch die Sera in ungefähr derselben Reihenfolge vor sich ging wie die Bakterienagglutination. Diese Ergebnisse lassen sich ungezwungen nur auf physikalische Unterschiede der verschiedenen Tiersera zurückführen, Unterschiede, deren Art und Ursache allerdings vorderhand unerklärt bleiben müssen.

Nun wissen wir durch die Untersuchungen Bordets, dafs der Agglutinationsvorgang sich in zwei Phasen zerlegen läfst, in eine erste, die in der Bindung des Agglutinins besteht, und in eine zweite, die einen physikalischen Ausflockungsvorgang darstellt. Auf Grund dieser Vorstellung könnte man annehmen, dafs allerdings im Serum für jede Bakterienart besondere Substanzen vorhanden sind, deren Bindung erst den Eintritt der Agglutination ermöglicht; dafs diese Stoffe aber in allen Seris stets im Überschufs vorhanden sind und Unterschiede im Agglutinationstiter der verschiedenen Sera durch sie nicht bewirkt werden, sondern dafs diese Verschiedenheiten vielmehr auf gewisse, bisher nicht bekannte physikalische Faktoren der Sera zurückzuführen sind, welche für die zweite, nicht spezifische Phase des Agglutinationsvorganges ausschlaggebende Bedeutung haben.

Diese Annahme, die sowohl den alten als auch den von mir gefundenen neuen Tatsachen genügen könnte, hat natürlich, solange sie nicht durch weitere Experimente gestützt ist, nur den Wert einer vorläufigen Hypothese. Meine Versuchsergebnisse erlauben nicht weiterzugehen, regen aber zu einer gründlichen Nachprüfung des Gesetzes der spezifischen Absorption an.

Über Hämagglutination und Hämatolyse.

Von

Prof. Dr. L. v. Liebermann,

Direktor des hygienischen Institutes der Universität Budapest.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Budapest.)

Vorbemerkung.

Seit den grundlegenden Arbeiten von J. Bordet[1]), P. Ehrlich und J. Morgenroth[2]) sind zwar zahlreiche Versuche über Hämagglutination und Hämatolyse mitgeteilt worden, aber darunter nur wenige, die wie die Arbeiten von Preston Kyes[3]), Kyes und Sachs[3]), K. Landsteiner und M. v. Eisler[4]), Ph. Eisenberg[5]), J. Bang und J. Forſsmann[6]), K. Landsteiner und N. Jagič[7]) unter Anwendung eigentlich chemischer Methoden die nähere Charakterisierung oder Isolierung der bei jenen Prozessen wirksamen Stoffe angestrebt und so unsere Einsicht in den Mechanismus dieser Prozesse wesentlich gefördert hätten.

Wir sind in dieser Beziehung bisher nicht viel weiter gekommen, als daſs es sich im allgemeinen um chemische Pro-

[1]) Ann. d. l'Inst. Pasteur, T. XII, p. 688 (1898).
[2]) Gesammelte Arbeiten über Immunitätsforschung, Berlin, 1904.
[3]) Ibidem.
[4]) Zentralbl. f. Bakteriolog. XXXIX, S. 309.
[5]) Ibidem XLI, S. 240.
[6]) Ibidem XL, S. 151.
[7]) München. med. Wochenschr. 1903.

zesse handeln dürfte, ein Resultat, welches aber schon nach den oben erwähnten grundlegenden Versuchen zu erwarten war.

Eine klare Vorstellung von dem, was da geschieht, wenn auch nur auf Grund mehr oder weniger begründeter Hypothesen, ist nach dem heutigen Stande der Dinge nicht möglich.

Daſs dem so ist, darüber kann man sich nicht wundern. Dieses Forschungsgebiet ist erst vor relativ kurzer Zeit erschlossen worden, und man hat es überdies mit den höchst kompliziert zusammengesetzten Blutkörperchen und Blutseris zu tun, welch letztere, da es sich um Immunsera handelt, schon wegen der Beschaffung ausreichenden Materials, einer chemischen Untersuchung groſse Schwierigkeiten bereiten.

Ich habe es daher für notwendig gehalten, zunächst verhältnismäſsig einfache, einer chemischen Untersuchung zugänglichere Reaktionen zu studieren, als es diejenigen sind, welche durch agglutinierende und hämatolytische Sera bewirkt werden, und erst auf Grund der so gewonnenen Erfahrungen auf das Studium der letztgenannten überzugehen. Ich glaube mich in der Richtigkeit des eingeschlagenen Weges nicht getäuscht und nun wirklich einige Anhaltspunkte gewonnen zu haben, welche es gestatten, derartigen Fragen näher zu treten.

Eine Übersicht über den Inhalt der folgenden Blätter mag den von mir eingeschlagenen Weg andeuten.

I. Über Hämagglutination durch Ricin und die Umstände, welche sie befördern oder verzögern.

II. Beziehungen zwischen Ricinagglutination und Hämatolyse, nebst Bemerkungen über Hämatolyse durch destilliertes Wasser.

III. Über die Wirkung von Kieselsäure auf Blutkörperchen.

IV. Über die hämatolytische Wirkung des Guajaksaponins.

V. Über hämatolytische Sera. Wirkung von Säuren und Alkalien.

VI. Über die Änderung der Hydroxyl-Ionen-Konzentration beim Inaktivieren der Sera und deren Einfluſs auf die Hämatolyse.

VII. Über den Nachweis und die Isolierung des hämatolytischen Immunkörpers.

VIII. Die Natur der hämatolytischen Komplemente und Immunkörper und der Mechanismus der Hämatolyse durch hämatolytisches Serum.

I. Über Hämagglutination durch Ricin.

1. Entsteht bei der Einwirkung von Ricin auf Blutkörperchen eine nachweisbare Ricinverbindung? Ist etwa die agglutinierte Masse eine solche und kann also demgemäfs das Ricin aus dieser wieder freigemacht werden?

Meine Versuche haben gezeigt, dafs diese Fragen bejaht werden müssen. Die agglutinierte Masse kann durch Salzsäure zerlegt werden und mit dem freigewordenen Ricin kann eine neue Portion Blutkörperchen agglutiniert werden. Als Beispiel folgender Versuch:

20 Tropfen einer 5 proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion [1]) wurden mit 2 Tropfen 0,25 proz. Ricinlösung (Ricin in physiologischer Na Cl-Lösung) versetzt und nach eingetretener Agglutination zentrifugiert. Die abgegossene Lösung agglutiniert nicht mehr.

Der Rückstand — die agglutinierte Masse — wurde mit 1 Tropfen $\frac{n}{10}$ H Cl und 10 Tropfen physiologischer Na Cl-Lösung behandelt. Nach einigem Stehen braune Lösung, welche, mit 1 Tropfen $\frac{n}{10}$ Na OH versetzt, neuerdings zugesetzte Blutkörperchen-Emulsion typisch agglutinierte. Zur Kontrolle ebenso behandelte, nicht agglutinierte (ricinfreie) Blutkörperchen gaben keine agglutinierende Flüssigkeit.

2. Mit welchem Bestandteile der Blutkörperchen verbindet sich das Ricin?

Die Versuche haben gezeigt, dafs es sich mit dem Stroma verbindet, mit dem Hämoglobin aber nicht.

Agglutinierte Blutkörperchen (ich habe eine Menge verwendet, welche aus 25 ccm Blutkörperchen-Emulsion und 5 ccm

[1]) Die mit physiologischer Na Cl-Lösung gewaschenen Blutkörperchen aus 5 ccm defibriniertem Schweineblut mit physiologischer Na Cl-Lösung auf 100 ccm gebracht.

einer 2 proz. Ricinlösung entstanden war) werden mit destilliertem Wasser behandelt. Dieses löst den Blutfarbstoff. Das Gemenge wird zentrifugiert, die Flüssigkeit abgegossen, abermals destilliertes Wasser zugesetzt, durchgeschüttelt, wieder zentrifugiert und wieder abgegossen. Dies wiederholt man so lange, bis aller Blutfarbstoff ausgewaschen ist und eine leicht grau gefärbte Masse zurückbleibt. Diese versieht man nun mit zehn Tropfen physiologischer NaCl-Lösung und einem Tropfen $\frac{n}{100}$ Salzsäure und erwärmt unter öfterem Durchschütteln ganz schwach, höchstens auf 40°. Dann filtriert man und setzt zu dem völlig klaren Filtrat drei Tropfen $\frac{n}{100}$ Natronlauge und zehn Tropfen einer Blutkörperchen-Emulsion. (Ich habe zu den Versuchen, wie schon früher erwähnt wurde, gewaschene Schweineblutkörperchen verwendet, 5 proz. Emulsion in physiologischer NaCl-Lösung.) Es tritt sofort typische Agglutination ein. — Kontrollversuche mit Blutkörperchen-Stromata ohne Ricin geben negatives Resultat.

Die oben erwähnte abzentrifugierte Blutfarbstofflösung wird mit ein paar Tropfen $\frac{n}{100}$ Salzsäure mäßig erwärmt, dann abfiltriert und mit $\frac{n}{100}$ Natronlauge genau neutralisiert, dann so viel NaCl zugesetzt, daß die Flüssigkeit einer 0,9 proz. NaCl-Lösung entspricht; dann setzt man etwa 20 Tropfen Blutkörperchen-Emulsion zu. Es tritt keine Agglutination ein. Auch nach 12 stündigem Stehen über Nacht habe ich unter dem Mikroskop die charakteristischen Veränderungen der Blutkörperchen nicht gesehen.

Das im vorigen Punkte erwähnte kann übrigens auch auf andere Weise gezeigt werden. Wenn man Blutkörperchen-Stromata in physiologischer NaCl-Lösung verteilt, dann ein paar Tropfen $\frac{n}{100}$ Natronlauge zusetzt, so entsteht eine anscheinend homogene, opake, visköse Flüssigkeit. Bei Zusatz von Ricinlösung entsteht ein Niederschlag.

Schon im Jahre 1888 hat R. Koberts Schüler Hermann Stillmark[1]) auf Grund seiner Versuche ausgesprochen, dafs Suspensionen von Blutkörperchen-Stromata (Pferdeblut) in physiologischer NaCl-Lösung von Ricinlösungen zu einem Niederschlag zusammengeballt werden, ferner dafs das Hämoglobin sich an der »Ricingerinnung« nicht beteiligt.

Meine in etwas abweichender Art ausgeführten Versuche bestätigen also die Angaben Stillmarks und erweitern sie durch den Nachweis, dafs hier wirklich eine Ricinverbindung entsteht und dafs den agglutinierten Blutkörperchen bzw. deren Stromata das Ricin durch geeignete Behandlung wieder entzogen werden kann.

3. Welche Umstände befördern oder verhindern die Ricinagglutination?

Diesbezügliche Versuche, zu denen sich Kaninchenblutkörperchen-Emulsionen besser eignen als solche aus Schweineblut, haben erwiesen, dafs die Ricinagglutination durch Zusatz von Säuren verzögert oder gar verhindert, durch Alkalihydroxyde aber gefördert wird.

Die Versuche wurden mit 5 proz. Kaninchenblutkörperchen-Emulsionen, 0,25 proz. Ricinlösungen (in 10 proz. NaCl-Lösung) und mit $\frac{n}{100}$ Säuren bzw. $\frac{n}{100}$ Natronlauge, welche mit Kochsalz auf den Gehalt einer physiologischen Kochsalzlösung gebracht worden waren, vorgenommen.

Seite 284 folgen einige derartige Versuche.

In einem anderen Versuch wurden die betreffenden Ricinlösungen mit Säure bzw. Lauge versetzt und dann der Blutkörperchen-Emulsion zugesetzt, nicht so wie in der obigen Versuchsreihe, wo Säure bzw. Lauge der Blutkörperchen-Emulsion und nicht der Ricinlösung zugesetzt wurden. Es machte dies im Resultat nur insofern einen Unterschied, als beobachtet werden

[1]) Arbeiten des pharmakologischen Instituts in Dorpat, herausgegeben von R. Kobert, S. 93—94.

konnte, daſs ein mit Lauge vorher versetztes Ricin langsamer agglutinierte, als reines Ricin, das der vorher mit Lauge versetzten Blutkörperchen-Emulsion zugesetzt wurde.

Tropfen.

Nr.	Blutk.-Emulsion	Ricinlösung	$\frac{n}{100}$ HCl	$\frac{n}{100}$ NaOH	phys. NaCl	Resultat der Beobachtung
I.	10	1	1	0	0	Überall Agglutination, jedoch am stärksten bei II.
II.	10	1	0	1	0	
III.	10	1	0	0	1	
I.	10	1	2	0	0	I. Agglutin. erst nach längerer Zeit.
II.	10	1	0	2	0	II. Agglutin. momentan.
III.	10	1	0	0	2	III. Agglutin. etwas später.
I.	10	1	3	0	0	I. Agglutin. erst nach längerer Zeit.
II.	10	1	0	3	0	II. Agglutin. momentan.
III.	10	1	0	0	3	III. Agglutin. viel später.
I.	10	1	5	0	0	I. Keine Aggl. Methämoglobinbldg.
II.	10	1	0	5	0	II. Agglutin. momentan.
III.	10	1	0	0	5	III. Agglutin. später und schwächer.
—	10	0	0	2	0	Keine unmittelbar zu beobachtende Aggl. Keine wesentliche Änderung.

Die die Agglutination verzögernde oder bei steigender Menge verhindernde Wirkung der Säure wurde nicht nur bei Salzsäure, sondern auch bei anderen Säuren, Schwefelsäure und Essigsäure, konstatiert, z. B. in folgendem Versuch mit Kaninchenblutkörperchen-Emulsion, mit Parallelbestimmungen, aus denen auch wieder die fördernde Wirkung der Lauge ersichtlich ist.

Nr.	Blutkörperchen-Emulsion			0,25 proz. Ricinlösung
I.	10 Tropfen	+ 3 Tropfen	phys. Na Cl-Lösung	+ 1 Tropfen
II.	10 »	+ 3 »	» »	+ 1 »
III.	10 »	+ 3 »	$\frac{n}{100}$ Salzsäure	+ 1 »
IV.	10 »	+ 3 »	» »	+ 1 »
V.	10 »	+ 3 »	» Schwefelsäure	+ 1 »
VI.	10 »	+ 3 »	» »	+ 1 »
VII.	10 »	+ 3 »	» Essigsäure	+ 1 »
VIII.	10 »	+ 3 »	» »	+ 1 »
IX.	10 »	+ 3 »	» Natronlauge	+ 1 »
X.	10 »	+ 3 »	» »	+ 1 »

Agglutination am schnellsten, fast augenblicklich in IX. und X., merklich später in I. und II.

Die übrigen zeigen innerhalb einer Stunde keine Agglutination.

Bezüglich des Einflusses der Lauge wurde ferner beobachtet, dafs es für die Menge derselben ein schon bei geringer Konzentration eintretendes Optimum gibt.

Versetzte man je zehn Tropfen Kaninchenblutkörperchen-Emulsion mit zwei, drei resp. vier Tropfen $\frac{n}{100}$ Natronlauge und dann mit je einem Tropfen 0,25 proz. Ricinlösung, so sah man deutlich, dafs die drei Tropfen Lauge enthaltende Flüssigkeit rascher agglutinierte als jene, welche nur zwei Tropfen Lauge enthielt, dafs aber vier Tropfen schon einen Rückgang in der Geschwindigkeit hervorriefen. Die Agglutination trat zwar noch immer schneller ein als ohne Lauge, aber schon langsamer als in jenen Proberöhrchen, welche nur drei Tropfen Lauge enthielten.

Alle diese Angaben beziehen sich, wie wiederholt bemerkt wurde, auf Kaninchenblutkörperchen-Emulsionen.

Bei Schweineblut wurde ein etwas abweichendes Verhalten beobachtet. Die verzögernde Wirkung der Säuren trat allerdings auch hier, wenn auch nicht so scharf wie bei Kaninchenblut, in Erscheinung, aber eine die Agglutination befördernde, beschleunigende Wirkung der Lauge war hier nicht zu konstatieren hie und da war sogar das Gegenteil der Fall.

Blutkörperchen verschiedenen Ursprungs können sich also gegen Säuren und Laugen verschieden verhalten.

4. Lassen sich die soeben (in Punkt 3) beschriebenen Beobachtungen mit den chemischen Eigenschaften des Ricins in Einklang bringen?

Aus meinen Versuchen ging zunächst hervor, dafs das Ricin säureartiger Natur ist oder, da es ja erwiesenermassen zum mindesten aus zwei verschiedenen Stoffen besteht[1]), einen Körper enthält, der die Eigenschaften einer schwachen Säure hat.

[1]) Siehe meine Arbeit: Sind Toxine Fermente? (Deutsche medizinische Wochenschrift 1905.)

Es kann ferner gezeigt werden, dafs diese Säure bei der Agglutination von den Blutkörperchen zurückgehalten wird. Sie ist es also, welche die Agglutination bewirkt.[1])

Zum Beweise diene folgendes:

a) Das Ricin (Mercksches Präparat) reagiert sauer.

Bringt man ein Stäubchen auf mit Wasser befeuchtetes blaues Lackmuspapier, so entsteht ein intensiv roter Fleck.

Ricin löst sich zum gröfsten Teil in destilliertem Wasser. Diese stark schäumende Lösung reagiert ebenfalls sauer.

Die saure Reaktion rührt nicht etwa von saueren Phosphaten her, denn tagelang dialysierte Ricinlösungen bleiben sauer und der durch Eindampfen einer solchen sauren Lösung gewonnene Rückstand hinterläfst eine Asche, welche nur Spuren von Phosphorsäure enthält.

Was den Grad der Azidität anbelangt, sei bemerkt, dafs es sich nicht etwa um Spuren einer solchen handelt, wie folgendes zeigt:

1 g Ricin (Merck) wurde mit 50 ccm destilliertem Wasser verrieben und filtriert.

5 ccm dieses Filtrats gaben nach dem Eindampfen und Trocknen einen Rückstand von 0,0786 g mit 0,0145 Asche (18,4 %).

Andere 5 ccm desselben Filtrats (entsprechend 0,0641 g aschefreier Substanz) wurden unter Anwendung von zwei Tropfen alkoholischer Hämatoxylinlösung mit $\frac{n}{100}$ Lauge titriert und verbrauchten von dieser 0,8 ccm.

Eine Lösung von Ricin in destilliertem Wasser, welche 1,282 % aschefreie Substanz enthält, entspricht daher ungefähr einer $\frac{2}{1000}$ normalen Säure $\left(\text{genauer } \frac{17}{10000}\right)$, d. h. ihre Azidität beträgt ungefähr $\frac{1}{6}$ einer $\frac{n}{100}$ Säure.

Ich will es nicht unerwähnt lassen, dafs die in Wasser leicht und völlig klar lösliche Asche nicht sauer, sondern

---

[1]) Siehe meine Arbeit: Sind Toxine Fermente? (Deutsche medizinische Wochenschrift.)

alkalisch reagiert. Ihre Lösung wird mit Hämotoxylin sofort blauviolett.

Der hier in Betracht kommende Körper ist also eine sehr schwache Säure, so dafs deren Salze stark hydrolysieren, was ein scharfes Erkennen der Endreaktion beim Titrieren mit ungeeigneten Indikatoren unmöglich macht. Eine durch Lackmus rot gefärbte Ricinlösung wird z. B. beim Neutralisieren mit Natronlauge nicht entschieden blau, sondern violett und verändert ihre Farbe nur allmählich gegen blau hin.

b) Dafs der saure Körper bei der Agglutination zurückgehalten wird, beweist folgender Versuch:

5 ccm einer 2proz. Ricinlösung wurden mit 25 ccm 5proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion zusammengebracht. Nach eingetretener Agglutination wurde abfiltriert. Von dem völlig klaren Filtrate wurden 10 ccm mit $\frac{n}{100}$ H Cl, andere 10 ccm mit $\frac{n}{100}$ NaOH unter Anwendung von Azolitminlösung als Indikator titriert. Man hatte von diesen Hundertstel-Normallösungen nur je 1—2 Tropfen zuzusetzen, um entschieden rote bzw. entschieden blaue Farbe hervorzurufen. Letzteres ist von Wichtigkeit, denn verwendet man zur Kontrolle eine reine Ricinlösung, so sieht man, dafs eine rein blaue Farbe, wie schon oben erwähnt, nicht zustande kommt.

Die von den agglutinierten Blutkörperchen abfiltrierte Lösung enthielt also den sauren Körper des Ricins nicht mehr.

Ich kann nun zur Beantwortung der Frage schreiten, welche die Aufschrift dieses (vierten) Punktes bildet.

Da der agglutinierende Bestandteil des Ricins eine Säure ist, und das Wesentlichste der Reaktion auf Blut darin besteht, dafs sich diese schwache Säure mit dem Stroma der Blutkörperchen verbindet, so ist schon von vornherein zu erwarten, dafs diese Reaktion durch die Anwesenheit einer stärkeren Säure gestört wird, ja geradezu verhindert werden kann, denn nun wird es eben diese stärkere Säure und nicht das Ricin sein, die sich mit dem Stroma zu einer Verbindung vereinigt, welche wohl ganz andere Eigenschaften haben dürfte, als die Ricin-Stromaverbindung, insbesondere nicht diejenige Eigenschaft, welche sich als Verkleben der Teilchen — als Agglutination — äufsert.

Was aber die agglutinationsbefördernde Wirkung der Lauge anbelangt, die übrigens, wie schon früher erwähnt, nicht bei allen Blutarten so ausgesprochen ist wie bei Kaninchenblut, so dürfte hier die bekannte quellende Wirkung der Alkalien auf eiweifsartige Körper und Lecithalbumine eine wesentliche Rolle spielen, welche, da dabei das Stroma in eine schleimig-zähe, klebrige Masse verwandelt wird, schon an und für sich zu einer Art Agglutination der Blutkörperchen führt. Auf diese Frage will ich in der nächsten Mitteilung noch zurückkommen.

5. Was ist also der Mechanismus der Ricinagglutination?

Da nachgewiesen wurde, dafs das Ricin ein säureartiger Körper ist oder zum mindesten einen solchen enthält; da dieser Körper Basen bindet und von den Blutkörperchen zurückgehalten wird; da ferner gezeigt wurde, dafs es das Stroma ist, mit welchem sich dieser säureartige Körper des Ricins verbindet, und dafs es aus dieser Verbindung durch eine stärkere Säure — Salzsäure — wieder freigemacht werden kann, so dafs es auf frische Blutkörperchen abermals agglutinierende Wirkung entfaltet, und da endlich bewiesen wurde, dafs die Agglutination verzögert wird, ja sogar ganz ausbleibt, wenn die Blutkörperchen vorher mit einer stärkeren Säure behandelt werden, was sich sehr leicht damit erklärt, dafs diese Säure, indem sie sich mit dem Stroma der roten Blutkörperchen verbindet, das Herantreten des Ricins und die Bildung einer Ricin-Stromaverbindung verhindert, ist man also berechtigt, sich folgende Vorstellung zu machen: Die Ricinhämagglutination kommt in der Weise zustande, dafs das Ricin als Säure mit dem Stroma der roten Blutkörperchen — welches also hier die Rolle einer Base spielt — eine Verbindung gibt, die aus der Flüssigkeit rasch ausfällt. Das Zusammenballen kleinerer Aggregate zu gröfseren wäre an und für sich keine besondere Eigentümlichkeit dieser Ricinverbindung. Ähnliches — das Anwachsen kleiner gefällter Partikelchen während ihrer Senkung,

durch Begegnung und Oberflächenanziehung — sieht man auch bei anderen Niederschlägen. — Eigentümlich für jene Verbindung wäre nur ihre klebrige Beschaffenheit, welche bewirkt, dafs die gröfseren Aggregate auf mechanischem Wege, z. B. durch energisches Schütteln, nicht mehr leicht zu trennen sind.

Bei dieser Reaktion — der Hämagglutination — geschieht aber auch noch etwas anderes. Das Ricin zersetzt eine Verbindung, aus der die roten Blutkörperchen der Hauptsache nach bestehen: nämlich die Verbindung von Stromasubstanz und Hämoglobin.

Durch die Annahme dieser Verbindung erklärt sich auch die eingangs dieser Mitteilungen erwähnte agglutinationsbefördernde Wirkung der Alkalien. Diese verbinden sich nämlich mit Hämoglobin, das ja nebenbei bemerkt immer als säureartiger Körper angesehen wurde[1]), welcher mit Basen Verbindungen eingehen kann (es ist z. B. in verdünnten Laugen leichter löslich als in Wasser), — und machen so das Stroma für den Angriff des Ricins frei.

Auch der früher erwähnte Umstand, dafs ein Überschufs von Alkali wieder verzögernd wirkt, dafs es also ein Optimum der Alkalimenge für die Agglutination gibt, ist erklärlich, da ein solcher Überschufs selbstverständlich dem Zustandekommen der Stromaricinverbindung infolge der gesteigerten Massenwirkung des Alkali entgegenwirken mufs.

Die Annahme einer chemischen Verbindung zwischen Blutfarbstoff und gewissen Bestandteilen des Stroma ist übrigens nichts Neues.

Schon F. Hoppe-Seyler[2]) hat auf die Notwendigkeit aufmerksam gemacht, die arteriellen Blutfarbstoffe von ihren Spaltungsprodukten, den Oxyhämoglobinen, die venösen von den Hämoglobinen zu unterscheiden.

Hoppe-Seyler macht folgende Bemerkungen:

---

[1]) S. auch E. Abel und O. v. Fürth. Chemiker-Zeitung 1906, Nr. 44 (Referat).

[2]) Physiologische Chemie III, 1881, S. 380; ferner: »Beiträge zur Kenntnis der Eigenschaften d. Blutfarbstoffe«, Zeitschr. für physiologische Chemie 13 (1889), S. 477.

1. Das in den roten Blutkörperchen enthaltene Oxyhämoglobin gibt beim Evakuieren den locker gebundenen Sauerstoff viel leichter und vollständiger ab, als reines Hämoglobin. Reine Oxyhämoglobinlösungen zersetzen sich teilweise, so dafs man bei Evakuieren nie die aus der Zusammensetzung berechnete Quantität Sauerstoff (167,39 ccm Sauerstoff von 0° und 760 mm Druck für 100 g Oxyhämoglobin) erhält, sondern stets weniger (die Hälfte bis zwei Drittel), ein Teil des Oxyhämoglobinsin Methämoglobin übergeht und ein dem fehlenden Reste fast entsprechendes Volumen von CO_2 entwickelt wird.

2. Dafs der Farbstoff in den Blutkörperchen nicht in einfacher Lösung, sondern wohl in engerer chemischer Verbindung steht, deren Zerlegung bei Zusatz von Wasser, Chloroform, Äther geschieht, ist auch durch andere Erscheinungen deutlich. Bestände eine solche Verbindung nicht, so wäre es unverständlich, dafs Blutkörperchen mit neutralen Salzlösungen gewaschen werden können, ohne an Farbstoff einzubüfsen, während der freie Farbstoff in diesen Salzlösungen doch stets löslich ist.

Wahrscheinlich ist das in Ather und Chloroform lösliche Lecithin mit dem Oxyhämoglobin in lockerer chemischer Verbindung in den roten Blutkörperchen enthalten.

Hämoglobin in wässeriger Lösung nimmt den Sauerstoff auf, aber die hierdurch entstandene Verbindung gibt den Sauerstoff viel schwieriger ab, als das Arterin, so dafs die Übertragung aus der Luft in die Organe viel unvollkommener erfolgen würde, als sie in Wirklichkeit durch die roten Blutkörperchen geschieht.

Wäre Oxyhämoglobin in den roten Blutkörperchen als solches enthalten, so würde auch eine Erholung nach CO-Vergiftung kaum möglich sein, da durch den Sauerstoff der Luft CO-Hämoglobin viel schwieriger zerlegt wird, als die CO-Verbindung des Phlebins (Farbstoff des venösen Blutes).

Ich habe diese Erwägungen ausführlich zitiert, um zu zeigen, dafs in der Tat schwerwiegende Gründe für die in Rede stehende Annahme sprechen.

Ich glaube auch, dafs hier dem Lecithin eine wesentliche Rolle zukommt, denn folgende Beobachtungen sprechen dafür.

Ich habe kristallisiertes Hämoglobin mit Lecithin unter Zusatz von etwas physiologischer NaCl-Lösung innig verrieben und gesehen, dafs diese bräunliche, trübe Flüssigkeit filtriert ein farbloses Filtrat gibt. Es mufste also das Hämoglobin vom Lecithin zurückgehalten worden sein, da ja Hämoglobin allein leicht löslich ist und durchs Filter geht.

Noch eklatanter fällt das Resultat aus, wenn man sich einerseits mit physiologischer NaCl-Lösung eine intensiv dunkel gefärbte Hämoglobinlösung, anderseits aus genügenden Mengen Lecithin gleichfalls mit physiologischer NaCl-Lösung eine Emulsion herstellt, dann beide Flüssigkeiten zusammengiefst und nach tüchtigem Durchschütteln filtriert. Das Filtrat ist fast farblos oder schwach gelblich, ungefähr wie das Filtrat der Lecithinemulsion allein.

Aus alledem mufs wohl geschlossen werden, dafs das Lecithin zu Hämoglobin eine gewisse Affinität besitzt, die ich nicht einmal schwach nennen kann, da die so entstandene Substanz (Lecithinhämoglobin) durch sehr verdünnte $\left(\frac{n}{100}\right)$ Salzsäure nicht gar so leicht, wenn auch immerhin zerlegt werden kann.

Wenn nun auch dieses und manches andere, worauf ich hier als nebensächlich nicht näher eingehen will, für eine Verbindung von Lecithin mit Hämoglobin spricht, so möchte ich doch nicht behaupten, dafs andere Bestandteile des Stroma dabei keine Rolle spielen, und zwar besonders aus dem Grunde nicht, weil es mir nicht gelungen ist, die Erscheinungen, wie sie sich bei Zusatz von Ricin zu Blutkörperchen-Emulsion darbieten, mit Lecithinhämoglobin nachzuahmen. Die mitunter zu beobachtende flockige Ausscheidung bei Zusatz einer Ricinlösung kann nur als Fingerzeig dafür gelten, dafs bei der Agglutination neben anderen Bestandteilen des Stroma auch das Lecithin eine Rolle spielen dürfte.

Über Hämagglutination und Hämatolyse.

II. Beziehungen zwischen Hämagglutination und Hämatolyse.

Von

L. v. Liebermann.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Budapest.)

Als Konsequenz der in der vorstehenden Abhandlung begründeten Auffassung der Ricinhämagglutination ergibt sich, dafs diese von einer Hämatolyse begleitet oder gefolgt sein mufs, da ja das Hämoglobin aus seiner Verbindung mit dem Stroma durch Ricin freigemacht wird.

Dafs tatsächlich auch Hämatolyse auftritt, haben auch schon andere bemerkt, die sich mit diesen Dingen beschäftigt haben.

Es läfst sich aber ferner auch noch zeigen, dafs die Hämatolyse, wie dies nach der oben erwähnten Anschauung zu erwarten ist, bei Zusatz steigender Mengen von Ricin immer stärker wird, bis zu einer bestimmten Grenze, welche erreicht wird, wenn der Vorrat an Blutkörperchen zur Bindung weiterer Ricinmengen nicht mehr ausreicht.

Als Beweis mögen einige Versuche mit 5proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion (gewaschene Blutkörperchen!) dienen:

Tropfen.

	Blutkörp.-Emulsion	0,25 proz. Ricin-Lösung	10 proz. NaCl-Lösung
I.	10	1	9
II.	10	2	8
III.	10	4	6
IV.	10	6	4
V.	10	8	2
VI.	10	10	0
VII.	10	0	10 (Kontrolle)

Nach eingetretener Agglutination wurde tüchtig durchgeschüttelt; dann kamen alle sieben Eprouvetten in den Thermostaten (37°). Nach etwa 3 Stunden wurde nach abermaligem Durchschütteln zentrifugiert.

I. und VII. nur sehr schwach gefärbt. II. bis VI. gradatim ansteigende Rotfärbung.

Tropfen.

	Blutkörp.-Emulsion	3 proz. Ricin-Lösung	physiol. NaCl-Lösung
I.	10	1	9
II.	10	2	8
III.	10	4	6
IV.	10	6	4
V.	10	8	2
VI.	10	10	0
VII.	10	0	10 (Kontrolle)

Die Proben wurden so wie vorher behandelt.

VII. (Kontrolle) kaum gefärbt. Von I. bis IV. ansteigende Rotfärbung. IV. schon blutrot. V. und VI. zeigen keine weitere Veränderung. Hier war die Hämatolyse schon fast ganz komplet. Mit 6 Tropfen 3 proz. Ricinlösung war also die oben erwähnte Grenze der Hämatolyse erreicht.

Da bei manchen Versuchen in den abzentrifugierten Lösungen auch quantitative Hämoglobinbestimmungen mit dem Fleischlschen Hämometer (in gelbbraunem Lichte) ausgeführt wurden, will ich, um zu zeigen, wie grofs die Differenzen sind, auch noch einen solchen Versuch mitteilen.

Tropfen.

	Blutkörp.-Emulsion	0,25 proz. Ricin-Lösung	10 proz. NaCl-Lösung
I.	10	2	10
II.	10	4	8
III.	10	6	6
IV.	10	8	4
V.	10	10	2
VI.	10	12	0
VII.	10	0	12

Um genügend Flüssigkeit zu haben, wurde jeder Eprouvette noch 1 ccm physiologische NaCl-Lösung zugesetzt.

2 Stunden im Thermostaten bei 37°. Nachher tüchtig durchgeschüttelt, zentrifugiert.

Hämoglobingehalt von I. = 33 der Hämometerskala.
» » II. = 83 » »
» » III. = 82 » »

IV., V., VI. zeigten dasselbe wie II. und III.

Es war also das Maximum der Hämotolyse schon in II. erreicht. Bei einer Vermehrung der Ricinlösung von 2 auf 4 Tropfen stieg die Hämatolyse auf das mehr als 2,5 fache.

Von sonstigen Beobachtungen sei erwähnt, dafs in den Zentrifugenrückständen ausgelaugte, gräulich-weifse Stromaanhäufungen in um so gröfserer Menge zu sehen waren, je ausgiebiger die Hämatolyse war und dafs starke, 2,5proz. und noch mehr 3proz. Ricinlösungen auch schon deutliche Methämoglobinbildung hervorriefen.

Aus all den Versuchen ergab sich mit Evidenz, dafs hier Hämagglutination und Hämatolyse durch ein und dieselbe Substanz bedingt, nur zwei Stadien derselben Reaktion darstellen.

Es soll nun ferner betont werden, dafs Säuren, wie bekannt, im allgemeinen Hämatolyse bewirken, was sich in derselbe Weise wie die Ricinwirkung erklärt. Der Säurerest verbindet sich mit dem Stroma und das Hämoglobin wird frei.

Aber auch Alkalien wirken hämatolytisch, wie ja dies bei der Annahme, dafs das Stroma und Hämoglobin in den

Blutkörperchen eine salzartige Verbindung darstellen, selbstverständlich ist. Es mufs hier nämlich der umgekehrte Prozefs wie bei der Wirkung von Säuren eintreten, indem sich nun das Hämoglobin mit dem Alkalimetall verbindet und das Stroma frei wird.

Es besteht aber ein beträchtlicher Unterschied zwischen der Intensität und Raschheit, mit der die Hämatolyse — der Übergang des Hämoglobins in die Lösung — bei Zusatz von Säuren und bei Zusatz von Alkalien in Erscheinung tritt, wovon man sich leicht überzeugen kann, wenn man äquivalente, mit physiologischer Na Cl-Lösung bereitete Säure- bzw. Alkalilösungen mit gleichen Mengen Blutkörperchen-Emulsion zusammenbringt. Die Säuren, auch Kohlensäure, wirken viel intensiver hämatolytisch, doch ist eine saure Reaktion der Flüssigkeit nicht nötig, um Hämatolyse zu bewirken, sondern es genügt eine Herabsetzung der Hydroxylionenkonzentration.

Versetzt man z. B. je 20 Tropfen Schweineblutkörperchen-Emulsion mit 10 Tropfen $\frac{n}{100}$ H Cl in physiologischer Na Cl-Lösung, resp. mit 10 Tropfen $\frac{n}{100}$ Na OH gleichfalls in physiologischer Na Cl-Lösung, schüttelt um und zentrifugiert nach etwa 5 Minuten ab, so ist die Säure enthaltende Flüssigkeit schon rötlich gefärbt, während die andere kaum gefärbt erscheint. Nach kurzem Aufenthalt im Thermostaten ist die abzentrifugierte, säurehaltige Flüssigkeit intensiv rot (mit bräunlichem Stich), der Rückstand weifsliches Stroma, die alkalihaltige aber nur schwach gefärbt, der Rückstand schleimig zähe.

Im Beginne der Einwirkung der Säure oder bei sehr wenig Säure findet auch Agglutination statt (kenntlich an der Konsistenz des Zentrifugenrückstandes, welche vom Rückstand zentrifugierter Blutkörperchen-Emulsion völlig verschieden ist), diese agglutinierten Massen zerfallen aber bei weiterer Einwirkung recht bald.

Ein Erklärungsversuch wäre folgender:

Es kann sein, dafs das Alkali, welches ja eiweifsartige oder solchen nahestehende Körper bekanntlich stark zum Quellen

bringt, auch zunächst auf die Oberfläche der Blutkörperchen eine solche Wirkung entfaltet und dafs die so entstandene gequollene Hülle ein tieferes Eindringen des Alkali verhindert oder nur langsam gestattet, so dafs sich das Entstehen der neuen Verbindung mehr auf die Oberfläche der Blutkörperchen beschränkt. Die Folge wäre ein wesentlich geringeres Mafs der Blutkörperchenzersetzung und Verringerung der Menge des in Lösung gehenden Hämoglobins.

Diese Vorstellung erleichtert gleichzeitig das Verständnis der Agglutinationserscheinung, denn es ist ja klar, dafs die gequollenen Hüllen der Blutkörperchen diese zum Verkleben viel geeigneter machen müssen.

Es ergibt sich aber ferner aus dieser Betrachtung die wichtige Folgerung, dafs alles, was die Quellung befördert, also was den Gehalt an freiem Alkali — die Hydroxylionenkonzentration — vermehrt, das Auftreten der Agglutinationserscheinung begünstigen, eine Verminderung des Alkaligehaltes aber die Agglutination weniger, dafür aber mehr die Hämatolyse befördern mufs. Die agglutinationsfördernde Wirkung des Alkali äufserte sich freilich nur unterhalb einer gewissen Grenze, da von einer bestimmten Konzentration aufwärts die Blutkörperchen durch die Lauge zerstört werden.

Das soeben Gesagte wird bestätigt durch meine Versuche über die befördernde Wirkung der Natronlauge auf die Ricinagglutination und der Säuren auf die Ricinhämatolyse, ferner durch meine vielfach gemachte Beobachtung, dafs Blutkörperchen-Emulsionen, denen etwas Alkali zugesetzt wurde (sehr wenig, einige Tropfen $\frac{n}{100}$ NaOH in physiologischer NaCl-Lösung zu etwa 2 ccm Emulsion), einen agglutinierten Zentrifugenrückstand geben, von dem die Lösung klar und leicht abgegossen werden kann, und der sowohl makro- als mikroskopisch das typische Verhalten kräftig agglutinierter Blutkörperchen zeigt.

Man mufs sich aber hüten, die Sache ganz schroff, etwa in der Weise aufzufassen, dafs etwa nur dort, wo freies Alkali vor-

handen, Agglutination und nur dort, wo freie Säure zugegen, Hämatolyse auftreten könnte. Das ist durchaus nicht der Fall, denn in beiden Fällen kann sowohl Agglutination als Hämatolyse auftreten. Auch Säuren bringen eiweifsähnliche Körper zum Quellen und zur Agglutination, wie ja das letztere auch durch das Verhalten des Ricins bewiesen wird. Nur darin besteht ein Unterschied, dafs bei Gegenwart von freiem Alkali mehr die Agglutination, bei Gegenwart freier Säure aber mehr die Hämatolyse in den Vordergrund tritt, wofür ich oben eine Erklärung versucht habe. Es ist das die notwendige Folge meiner Auffassung, dafs Hämagglutination und Hämatolyse eine gemeinsame Ursache haben, die chemische Zersetzung der Blutkörperchen in ihre zwei Hauptbestandteile: Stroma und Hämoglobin. Dabei ist aber wohl zu bemerken, dafs zwar Hämatolyse auch ohne vorhergehende Agglutination stattfinden kann, wenn die neuentstandene Stromasäureverbindung wenig Neigung zum Quellen und zum Klebrigwerden hat, wie das der Fall ist, wenn gröfsere Mengen stark dissoziierender Säuren einwirken; dafs aber umgekehrt Agglutination ohne nachfolgende Hämatolyse nicht stattfindet. Wo man solches dennoch zu sehen glaubt, handelt es sich um eine Täuschung, deren Ursache darin zu finden ist, dafs man dem Hämoglobin nicht genügend Zeit liefs, aus der gequollenen agglutinierten Masse hinauszudiffundieren, und dafs die Menge desselben auch zu gering sein kann, um die Hämatolyse, bei nicht sehr genauer quantitativer Bestimmung, deutlich erkennen zu lassen, gering darum, weil sich die chemische Veränderung der Blutkörperchen, wie schon früher erwähnt wurde, bei stark agglutinierenden Körpern, ferner bei zu geringer Menge derselben und bei zu kurzer Zeit mehr auf ihre Oberfläche beschränken dürfte. Auch daran ist zu erinnern, dafs bei starker Agglutination die Oberfläche, welche die Blutkörperchen der umgebenden Flüssigkeit bieten, ganz aufserordentlich verringert wird, was den Übertritt des freigewordenen Hämoglobins in die Flüssigkeit beträchtich verzögert.

Zum Schlusse noch eine naheliegende Frage.

Wie ist die hämatolytische Wirkung des destillierten Wassers zu erklären?

Ich fasse diese Art von Hämatolyse als Hydrolyse auf, welche jedesmal auftritt, wenn eine aus einer schwachen Säure und einer Base bestehende Verbindung mit Wasser zusammenkommt. Es kann aber kein Zweifel darüber bestehen, dafs die Verbindung von Hämoglobin und Stroma nur eine derartige sein kann. Die Verbindung der roten Blutkörperchen Arterin resp. Phlebin wird also durch Wasser, welches in die Blutkörperchen dringt, in Hydroxylverbindung des hier wirksamen Stromabestandteiles und in die Hämoglobinwasserstoff-Verbindung (Hämoglobinsäure, vulgo Hämoglobin) zerlegt, ebenso wie z. B. kohlensaures Kalium bei Einwirkung von Wasser teilweise in KOH und H_2CO_3 zerfällt.

Die Hämatolyse durch destilliertes Wasser ist also ein Vorgang, der mit Osmose beginnt und mit Hydrolyse endigt.

Über Hämagglutination und Hämatolyse.

III. Uber die Wirkung von Kieselsäure auf rote Blutkörperchen.

Von

L. und P. v. Liebermann.

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Budapest.)

Auf die agglutinierende Wirkung der Kieselsäure hat zuerst R. Koberts Schüler A. Siegfried[1]) aufmerksam gemacht, der sie in Form ihrer Salze verwendet hat. Er fand auch, dafs die Agglutination der roten Blutkörperchen unter Umständen von Hämatolyse begleitet ist, und fafst letztere als einen sekundären Prozefs auf.

Später haben bekanntlich Landsteiner und Jagič[2]) die Wirkung der kolloidalen Kieselsäure untersucht, dasselbe gefunden, aber auch noch angegeben, dafs das Lecithin mit Kieselsäure bei Gegenwart von Kochsalz eine die Hämatolyse befördernde Verbindung eingeht.

Auch wir haben diese Versuche mit vollständig ausgewaschener in physiologischer NaCl-Lösung suspendierter kolloidaler Kieselsäure ohne Lecithin nachgemacht unter Anwendung von 5proz. Kaninchen-Blutkörperchen-Emulsion, und nach etwa ½stündigem Stehenlassen der Mischungen im Thermostaten bei

1) R. Kobert, Lehrb. d. Intoxikationen. II. Bd. (1903.) S. 714.

2) Wiener klin. Wochenschr., 1904, Nr. 3. Münch. med. Wochenschr., 1904, Nr. 27.

37° gefunden, dafs die Agglutination, wie auch die soeben zitierten Autoren angeben, stets von Hämatolyse begleitet ist, wenn man nur dafür sorgt dafs die agglutinierten Massen gut zerschüttelt werden, ferner, dafs die Hämatolyse mit steigenden Mengen von Kieselsäure steigt, ja dafs sie vollständig wird, so dafs der abzentrifugierte Rückstand hämoglobinfrei erhalten werden kann, was Landsteiner und Jagič nicht bemerkt haben, weil sie den Einflufs steigender Mengen Kieselsäure nicht in den Kreis ihrer Versuche gezogen hatten.

Wir haben ferner gefunden, dafs es auch hier das Stroma ist, mit welchem sich die Kieselsäure zunächst verbindet. Die abzentrifugierte Hämoglobinlösung kann keine beträchtlicheren Mengen derselben enthalten, weil das Hämoglobin aus einer solchen Lösung durch die oben erwähnte Suspension von Kieselsäure ausgefüllt wird.

Dies ist auch der Grund für eine Beobachtung, die wir anfangs nicht gleich erklären konnten. Wir fanden nämlich, dafs über eine gewisse Grenze hinaus bei steigendem Kieselsäurezusatz die Hämatolyse wieder schwächer wird. Dies ist aber nach dem oben Mitgeteilten nur scheinbar der Fall. Die schwächere Hämatolyse wird durch eine partielle Ausfällung des Hämoglobins nur vorgetäuscht.

Über Hämagglutination und Hämatolyse.

IV. Über die hämatolytische Wirkung des Guajaksaponins.

Von

L. und P. v. Liebermann.

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Budapest.)

Schon vor längerer Zeit hat R. Kobert die hämatolytische Wirkung der Saponinsubstanzen entdeckt. Diesen Gegenstand haben auch mehrere seiner Schüler, zuletzt Walter Friboes, verfolgt, der sich besonders eingehend mit den Guajaksaponinen befafst hat.[1])

Zu unseren Versuchen verwendeten wir das sog. »neutrale Guajaksaponin«, bezogen von E. Merck in Darmstadt, wollen aber gleich bemerken, dafs dieses Präparat nicht neutral, sondern sauer reagiert.

Wir versetzten zunächst 20 ccm einer 5 proz. Kaninchenblutkörperchen-Emulsion[2]) mit 1 ccm einer 1 proz., mit physiologischer NaCl-Lösung bereiteten Saponinlösung. Schon nach kurzer Zeit war vollständige Hämatolyse eingetreten.

Die lackfarbige Lösung wurde zentrifugiert und die zurückgebliebene Stromata mit physiologischer NaCl-Lösung, gleichfalls

---

1) Beiträge zur Kenntnis der Guajacpräparate. Von Walther Friboes. Mit einem Vorworte von R. Kobert. Stuttgart, 1903.

2) Wie immer bei unseren Versuchen ist hier eine Blutkörperchen-Aufschwemmung in phys. NaCl zu verstehen, welche keine Serumbestandteile enthält, sondern aus gründlich gewaschenen Blutkörperchen in der Weise dargestellt wird, dafs sie in 100 ccm die reinen Blutkörperchen von 5 ccm Blut enthält.

durch Zentrifugieren, gewaschen. Sie waren nun absolut hämoglobinfrei. Mit etwas physiologischer NaCl aufgenommen und nach Zusatz einer Spur von sehr verdünnter Schwefelsäure erhält man eine trübe Flüssigkeit, die beim Schütteln stark schäumt, während eine ebenso behandelte Flüssigkeit, die aber nur Stromata enthält, welche aus Blutkörperchen-Emulsion mit destilliertem Wasser bereitet werden, nicht schäumt.

Dies war ein Fingerzeig, dafs das Saponin an die Stromata gebunden war, da eine der charakteristischen Eigenschaften der Saponine eben das Schäumen ist. Um uns aber mit Sicherheit zu überzeugen, ob das Saponin wirklich und vollständig gebunden wird, also bei der Reaktion verschwindet, haben wir Blutkörperchen-Emulsion mit einer zur vollständigen Hämatolyse ungenügenden Menge von Saponin versetzt, von den unangegriffenen Blutkörperchen abzentrifugiert, die abzentrifugierte Flüssigkeit mit einer frischen Portion Blutkörperchen versetzt und durch quantitative Hämoglobinbestimmung festgestellt, dafs keine weitere Lösung von Hämoglobin stattgefunden hat.

5 ccm 100 proz. Kaninchenblutk.-Emulsion wurden mit 0,25 ccm einer 1 proz. Saponinlösung (mit physiologischer NaCl-Lösung bereitet) versetzt, mit physiologischer NaCl auf 10 ccm verdünnt und zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wollen wir mit A bezeichnen.

Nun wurden vier Proberöhrchen in folgender Weise beschickt:

1. 2 ccm A + 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung,
2. 2 ccm A + 2 ccm 5 proz. Kaninchenblutkörperchen-Emulsion,
3. 2 ccm 5 proz. Kaninchenblutkörperchen-Emulsion + 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung, welche dieselbe Menge Saponin enthält, welche 2 ccm A enthalten mufsten, falls das Saponin nicht verbraucht werden sollte. Es war diese Kontrolle notwendig, um zu wissen, ob das Saponin in dieser Menge noch genügend wirkt.
4. 2 ccm 5 proz. Blutkörperchen-Emulsion + 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung. Diese Kontrolle war notwendig,

weil die schon etwas gestandene Blutkörperchenlösung selbst etwas hämatolysiert war.

Die Bestimmungen in den abzentrifugierten Flüssigkeiten geschahen mit dem Fleischl-Miescherschen Hämometer unter den Kautelen, wie sie der eine von uns empfohlen hat.[1]) Die Mittel aus 10 gut stimmenden Ablesungen waren folgende:

1. 64 Grade,
2. 88 »
3. 111 »
4. 33 »

Wird Nr. 4 von Nr. 2 abgezogen (88 — 33), so bleiben 55 Grade. Ein Zusatz von frischen Blutkörperchen zu A hat also keine Vermehrung des gelösten Hämoglobins bewirkt. Es war also bei der Reaktion alles Saponin verbraucht worden.

Es sollte nun mit möglichster Genauigkeit bestimmt werden, ob das Saponin ausschliefslich vom Stroma der Blutkörperchen gebunden wird, oder ob dies auch das Hämoglobin imstande ist? Von der Antwort auf diese Frage hing es nämlich ab, ob es gestattet ist, den Mechanismus der Saponinwirkung für einen der Ricinwirkung ähnlichen zu halten. Die Versuche haben ergeben, dafs dies, trotz der äufserlichen Verschiedenheit der beiden Reaktionen (Saponin bewirkt keine sinnfällige Agglutination) wirklich der Fall ist, dafs also das Saponin das Arterin (Phlebin) in ähnlicher Weise zersetzt, wie es das Ricin tut.

Wir verfuhren auf folgende Weise: 3 ccm 100proz. Kaninchenblutkörperchen-Emulsion wurden mit destilliertem Wasser auf 50 ccm verdünnt. Die vollständig lackfarbene Flüssigkeit wurde mit soviel Kochsalz versetzt, dafs sie einer 0,9proz. NaCl-Lösung entsprach, dann zentrifugiert und das Stroma vollständig entfernt.

Von der abgegossenen Hämoglobinlösung wurden 30 ccm mit 0,15 g Saponin versetzt, also mit soviel, dafs sie einer $^1/_2$proz. Saponinlösung entsprach. Nun wurde die Wirkung dieser

1) Siehe L. v. Liebermann, Deutsche med. Wochenschr., 1906, Nr. 7. (Anmerkung.)

$^1/_2$ proz. Hämoglobin-Saponinlösung auf frische Blutkörperchen mit der einer gleichfalls $^1/_2$ proz. Saponin enthaltenden physiologischen Kochsalzlösung verglichen, indem wir zu 6 ccm Blutkörperchen-Emulsion je 0,25 ccm der erwähnten, bezüglich ihres Saponingehaltes gleich konzentrierten Lösungen zusetzten. (Die Menge von 0,25 ccm war durch vorausgehende Bestimmungen als diejenige ermittelt, welche nach $^3/_4$ stündigem Stehen bei Zimmertemperatur 6 ccm der 5 proz. Blutkörperchen-Emulsion noch nicht vollständig zu hämatolysieren imstande war.) War nun das Saponin vom Hämoglobin nicht gebunden worden, so mufste der Zuwachs an gelöstem Hämoglobin in der Mischung, welche mit Hämoglobin bereitete Saponinlösung enthielt, ungefähr ebensoviel betragen, als die Hämoglobinmenge beträgt, welche durch die reine (nicht hämoglobinhaltige) gleich konzentrierte Saponinlösung freigemacht wurde.

Nach etwa $^3/_4$ stündigem Stehen der Mischungen bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert, die Lösungen wurden von dem klebrigen, roten, festhaftenden Rückstand klar abgegossen und es wurde ihr Hämoglobingehalt mit dem Fleischl-Miescherschen Hämometer bestimmt.

Zur Kontrolle haben wir auch den Hämoglobingehalt einer Lösung bestimmt, welche aus 6 ccm Blutkörper-Emulsion mit 0,25 ccm derselben Hämoglobinlösung, welche zur Bereitung der $^1/_2$ proz. Hämoglobin-Saponinlösung diente, durch Zentrifugieren erhalten wurde und vorher gleichlange wie die anderen Mischungen gestanden war, da ja der Hämoglobingehalt dieser letzteren bekannt sein mufste. Das Resultat war folgendes:

1. Hämoglobingehalt der Mischung mit reiner Saponinlösung = 190 Grade,
2. Hämoglobin-Saponinlösung = 211 Grade,
3. Hämoglobinlösung ohne Saponin = 28 Grade.

1. und 2. mufsten wegen zu starker Hämoglobingehalte mit dem gleichen Volum Wasser verdünnt werden. Die angegebenen Zahlen wurden durch Multiplikation mit 2 erhalten. — Wird nun 3. von 2. abgezogen, so erhalten wir:

1. = 190,
2. = 183.

Bei dreifacher Verdünnung bestimmt, erhielten wir, auf ursprüngliche Konzentration umgerechnet:

1. = 207,
2. = 238,
3. = 22 (neuerdings bestimmt).

Wird 3. von 2. abgezogen, so haben wir:

1. = 207,
2. = 216.

Man sieht: die Differenzen bewegen sich innerhalb der bei dieser Methode möglichen Versuchsfehler.

Man kann also mit Bestimmtheit aussprechen, dafs bei der Wirkung des neutralen Guajaksaponins auf Blutkörperchen dasselbe geschieht, wie bei der Wirkung des Ricins: das Saponin verbindet sich nur mit dem Stroma, nicht aber mit dem Hämoglobin.

Es war nun interessant, weiter zu untersuchen, ob Alkalien auch bei der Saponinwirkung der Hämatolyse entgegenwirken?

Dies ist in der Tat der Fall. Versetzt man 0,5 ccm einer $^1/_2$ proz. Saponinlösung (mit physiologischer NaCl bereitet) mit 2 ccm einer $\frac{n}{100}$ gleichfalls mit physiologischer NaCl-Lösung bereiteten Natronlauge und 3 ccm einer 5 proz. Kaninchenblutkörperchen-Emulsion, so findet innerhalb einer Stunde kaum Hämatolyse statt (erst nach längerer Zeit ist solche zu bemerken), während ohne Zusatz von Natronlauge die Hämatolyse in sehr kurzer Zeit — sie zählt nur nach Minuten — vollständig ist.

Ganz ebenso wird die Saponin-Hämatolyse auch durch Blutserum (Kaninchenserum) verhindert. Verwendet man statt 2 ccm $\frac{n}{100}$ Natronlauge 0,6 ccm normales Kaninchenblutserum, eine Menge, deren titrirbarer Alkaligehalt ungefähr dem Alkaligehalt von 2 ccm $\frac{n}{100}$ Natronlauge entspricht,

so wird die Hämatolyse gleichfalls verhindert. Aber auch schon die Hälfte der Serummenge genügt, woraus folgt, dafs auch noch andere Bestandteile hier eine Rolle spielen.[1]

In dieser Beobachtung sehen wir eine weitere Bestätigung der Ähnlichkeit des Mechanismus der bisher von uns studierten Agglutinations- und hämatolytischen Phänomene, wenn sie auch äufserlich durch Vorwalten der einen oder der andern Wirkung verschieden scheinen.

Unsere, die Saponinhämatolyse hemmende Wirkung des Blutserums betreffende Beobachtung glauben wir zur Erklärung eines Widerspruchs verwenden zu können, der zwischen unseren Angaben und denjenigen von Walter Friboes besteht, der gefunden hat, dafs dem neutralen Guajaksaponin kaum irgendwelche hämatolytische Wirkung zukommt[2]; denn Friboes hat das Saponin auf Blutkochsalzmischungen, also auf serumhaltige Gemische, nicht aber auf gewaschene Blutkörperchen einwirken lassen.

Unsere Versuche haben aber gezeigt, dafs die erwähnte hemmende Wirkung des Serums zu einer Erklärung nicht genügt; denn erstens ist sie nur eine — allerdings beträchtlich — verzögernde, indem z. B. 2 ccm 5proz. Kaninchenblutkochsalzlösung mit 0,5 ccm einer $^1/_2$proz. Saponinkochsalzlösung versetzt, erst nach einer Stunde deutliche, aber noch lange nicht vollständige Hämatolyse zeigt, während eine 5proz. Blutkörperchen-Emulsion vom selben Blutkörperchengehalt (aus gewaschenen Blutkörperchen bereitet) schon nach wenigen Minuten durch dieselbe Menge Saponin vollständig hämatolysiert wird; zweitens ist ein Unterschied zwischen Blut- resp.

1) Nach einer Angabe von Ransom (Deutsche med. Wochenschr. 1901) schützt das Cholesterin des Blutserums die Blutkörperchen vor dem Angriff des Saponins. Bei Versuchen mit Schweineblutkörperchen und Guajaksaponin (ungiftiges) konnte ich eine derartige schützende Wirkung nicht beobachten, mochte ich nun Cholesterin direkt in der Saponinlösung verteilen, oder es der Saponinlösung in Form einer Emulsion zufügen, wie man eine solche erhält, wenn man Cholesterine in Alkohol löst und die Lösung mit viel phys. Kochsalzlösung versetzt.

2) a. a. O.

Blutkörperchenkochsalzmischungen gar nicht wahrzunehmen (und wenn ja, noch eher zugunsten der Blutmischungen, welche mitunter noch rascher hämatolysiert werden), wenn man Mengenverhältnisse nimmt, wie sie Friboes angewendet hat; z. B. 10 ccm 5 proz. Kaninchenblutkochsalzmischung + 1 ccm 10 proz. Saponinlösung. Wir haben solche Versuche mit Kaninchen- und Schweineblut resp. mit Blutkörperchen-Emulsionen aus diesen Blutarten gemacht. Alles wurde, wie schon erwähnt, in wenigen Minuten und fast gleich schnell vollkommen hämatolysiert.

Es bleibt also nichts anderes übrig, als anzunehmen, dafs unser Saponinpräparat (von der Merckschen Fabrik als neutral und ungiftig bezeichnet) von demjenigen verschieden ist, welches Friboes in Händen hatte. Dafür spricht auch der schon erwähnte Umstand, dafs unseres sauer reagierte, während Friboes ausdrücklich sagt, dafs sein Präparat neutral war.[1])

An eine Verwechslung mit Guajaksaponinsäure, welche auch nach Friboes sauer reagiert, ist nicht zu denken, denn auch diese besitzt, nach dem genannten Autor, nur geringes hämatolytisches Vermögen, während unseres schon in minimalen Mengen äufserst wirksam ist.

Wir glauben unsere Mitteilung nicht schliefsen zu dürfen, ohne besonders zu betonen, dafs es nach unseren Erfahrungen nicht ratsam ist, zu hämatolytischen Versuchen statt Blutkörperchen-Emulsionen aus gewaschenen Blutkörperchen einfach Blutkochsalzmischungen zu verwenden, wie das so häufig geschieht, in der Voraussetzung, dafs die geringe Serummenge, welche z. B. in einer 5 proz. Blutkochsalzmischung bleibt, zu gering wäre, um das Resultat zu beeinflussen. Wir haben oben bei unseren Versuchen mit $^1/_2$ proz. Saponinlösungen gezeigt, dafs dies nicht immer zutrifft.

---

1) a. a. O., S. 60.

Über Hämagglutination und Hämatolyse.

V. Über hämatolytische Sera. Wirkung von Säure und Alkali.

Von

L. v. Liebermann.

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Budapest.)

Die in den vorstehenden Mitteilungen beschriebenen Versuche über die Wirkung des Ricins, der Kieselsäure und des Guajaksaponins auf rote Blutkörperchen haben folgendes gezeigt:

Erstens, dafs bei der Agglutination, welche die erstgenannten zwei Stoffe bewirken, eine Zersetzung des Arterins (Phlebins) stattfindet, so dafs die entsprechenden Verbindungen zwischen Stroma und jenen Körpern zustande kommen und dafs hierbei das Hämoglobin frei wird, welches nun in die umgebende Flüssigkeit vollständig diffundieren kann, wenn die agglutinierte Masse nur genügend zerteilt durchgeschüttelt wird, damit durch die genügend feine Verteilung, die eine möglichst grofse Oberfläche schafft, für die Diffusion des Hämoglobins günstige Bedingungen geschaffen werden.

Es gibt also eine Art von Hämatolyse, welche als notwendige Begleiterscheinung der Agglutination aufgefafst werden mufs.

Zweitens wurde beim Studium der Guajaksaponinwirkung gefunden, dafs sich der Mechanismus dieser von dem der Ricin- und Kieselsäurewirkung nicht unterscheidet. Der Unterschied in der Wirkung besteht nur darin, dafs das Saponin ohne auffällige Agglutination sofort Hämatolyse hervorruft.

Es gibt also eine andere Art von Hämatolyse, welche ohne vorhergehende sinnfällige Agglutination, aber ebenfalls ohne Mitwirkung etwa eines dritten Körpers zustandekommt.

Drittens wurde — bei den Ricinversuchen — konstatiert, daſs der Grad der Alkalizität der Flüssigkeit, in welcher die Reaktion abläuft, auf diese von wesentlichem Einfluſs sein kann.

Es frägt sich nun: entsprechen diese bisher studierten Vorgänge denjenigen, die wir bei agglutinierenden und hämatolytischen Seris beobachten, oder haben wir es bei diesen mit Wirkungen zu tun, welche auf andere Weise erklärt werden müssen?

Das Studium dieser Frage hat nun gezeigt, daſs man in der Tat berechtigt ist, hier weitgehende Analogien anzunehmen, anderseits aber hat es zur Kenntnis neuer und wie ich glaube, wichtiger Tatsachen geführt, die darauf hinweisen, daſs bei den Wirkungen der Immunsera auſser jenen Prozessen, welche in den Wirkungen des Ricins, der Kieselsäure und des Saponins ein Analogon finden, auch noch Reaktionen anderer Art eine Rolle spielen.

Lapins, deren Serum übrigens, wie schon in der vorstehenden Mitteilung erwähnt wurde, häufig schon normalerweise auf Schweineblutkörperchen wirkende Antikörper enthält, wurden durch subkutane Injektion von 5 proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion (aus mit physiologischer NaCl-Lösung gründlich gewaschenen Blutkörperchen bereitet!) gegen diese immunisiert. An 5—6 aufeinanderfolgenden Tagen werden je 1, höchstens 2 ccm Blutkörperchen-Emulsion injiziert. Vier solche groſse Kaninchen liefern beim Einstich in eine gröſsere Ohrvene, wenn man durch Streichen von der Ohrwurzel gegen die Spitze die Blutung befördert, genügende Mengen Blut. Man erhält so leicht genügendes Material zu solchen Versuchen. Das Blut wird sofort zentrifugiert, und nach einigem Stehen im Eisschranke scheidet sich reines Serum ab, welches klar abgegossen werden kann. Auf dieselbe Weise wurden von nicht immunisierten Lapins Normalsera erhalten.

Die Sera wurden zur Inaktivierung, wie gebräuchlich, $^1/_2$ Stunde auf 56° erwärmt.

Das Resultat der Beobachtungen an den Mischungen, welche sich in den mit römischen Zahlen bezeichneten Eprouvetten befanden, nachdem sie eine Stunde bei 37° im Thermostaten verweilt hatten und dann zentrifugiert wurden, war folgendes:

I.	10 Tropfen	Schweineblutkörperchen-Emulsion	+ 3 Tropfen inaktives Immunserum.
II.	10 »		+ 6 » » »
III.	10 »		+ 3 » aktives »
IV.	10 »		+ 6 » » »
V.	10 »		+ 3 » phys. Kochsalzlösung.
VI.	10 »		+ 6 » » »

I. und II. Zentrifugenrückstand: *stark agglutiniert*. Unter dem Mikroskope zum großen Teile *sternförmige, agglutinierte Blutkörperchen*, daneben schon reichlich *körniger Detritus*. Abzentrifugierte Lösung: schwache, rötliche Färbung (Hämatolyse).

III. *Starke Agglutination* und *starke Hämatolyse*. Die agglutinierten Massen lassen sich leichter zerschütteln. Mikroskopisches Bild: nicht wesentlich verschieden.

IV. Agglutination makroskopisch kaum mehr zu erkennen. Hämatolyse vollständig, das meiste gelöst. Unter dem Mikroskop nur noch wenige kleine, gefärbte, agglutinierte Gruppen. Sehr viel körniger Detritus.

V. und VI. als Kontrollflüssigkeit geben bezüglich Rotfärbung der Lösung, Agglutination makro- und mikroskopisch negative Resultate.

Dieser Versuch lehrt folgendes:

Inaktiviertes Immunserum agglutiniert, wie dies ja übrigens allgemein bekannt ist.

Hier, wie im folgenden überall, ist jedoch unter Agglutination nicht die prompte, fast einer momentan einstehenden Gerinnung ähnliche Ausscheidung zusammengeballter Blutkörperchen zu verstehen, sondern die eigentümliche Beschaffenheit des Zentrifugierungsrückstandes. Diese ist vom auf gleiche Weise erhaltenen Rückstande einfacher Blutkörperchen-Emulsion wesentlich verschieden. Während nämlich dieser letztere so locker ist, daſs Vorsicht nötig ist, die Flüssigkeit ohne Aufwirbeln der Blutkörperchen klar abzugieſsen und er, unter dem Mikroskope gesehen, aus *isolierten* Blutkörper-

chen besteht, ist der Rückstand mit Serum behandelter Blutkörperchen fest, klebrig, mehr oder weniger schwer zu zerschütteln; die Flüssigkeit kann leicht vollständig abgegossen werden. Unter dem Mikroskope ist aber das typische Bild zu grofsen Haufen agglutinierter, mehr oder weniger veränderter Blutkörperchen durchaus nicht immer zu sehen. Diese Art schwacher Agglutination könnte man aus praktischen Gründen anders, vielleicht Agglomeration (eine Bezeichnung, die schon Bordet gebraucht) oder sonstwie, nennen, obwohl im Wesen der Reaktion zwischen dieser und der starken — wie wir glauben — kein Unterschied besteht.

Im Gefolge der Agglutination tritt wenn auch schwache Hämatolyse auf, die aber nur dann (aber auch nicht immer!) etwas ausgesprochener erscheint, wenn man gröfsere Mengen und kräftige Sera verwendet und unter öfterem Umschütteln längere Zeit im Thermostaten stehen läfst.

Eine gewisse Ähnlichkeit zwischen dieser und der agglutinierenden Wirkung von Ricin oder Kieselsäure besteht also wahrscheinlich, aber sie wäre allein nicht so grofs, um aus ihr weitergehende Schlüsse zu ziehen.

Wichtiger ist folgendes:

Nach dem Muster meiner Ricinversuche habe ich durch inaktiviertes Kaninchenserum agglutinierten Schweineblutkörperchen durch Behandeln mit sehr verdünnter Salzsäure (mit physiologischer NaCl-Lösung bereitete $\frac{n}{100}$ Säure) den agglutinierenden Körper wieder entzogen, ja, es gelang mir auch nachzuweisen, dafs bei dieser Behandlung auch das wieder abgespalten wird und erhalten werden kann, was man hämolytischen Immunkörper (Ehrlichs Amboceptor) nennt, von dem es einstweilen unentschieden bleibt, ob er mit dem Agglutinin identisch ist oder nicht.

An diesen Arbeiten hat sich später auch mein Assistent Herr v. Fenyvessy beteiligt. Wir werden sie in einem besonderen Artikel beschreiben, da ihre Bedeutung eine eingehende Darstellung erfordert.

Die identische Methode der Isolierung berechtigt schon zur Annahme, dafs das Serumagglutinin (Hämolysin) ein in seinem Verhalten dem Ricin ähnlicher Stoff, also wohl auch wie dieser eine

Säure oder ein Gemenge von säureartigen Körpern sein dürfte, woraus dann weiter folgt, daſs auch der Mechanismus dieser Agglutination ein ähnlicher ist wie bei Ricin, Kieselsäure und Saponin, daſs also das Serumagglutinin das Arterin (Phlebin) in der Weise zersetzt, daſs es sich mit dem Stroma verbindet und das Hämoglobin freimacht.

Dies wird auch dadurch gestützt, daſs ein Zusatz von Säure oder Alkali eine ähnliche Wirkung auf Agglutination bzw. Hämatolyse durch Sera ausübt, wie wir dies bei den Ricinversuchen gesehen haben. Auch bei den hämatolytischen Seris befördert die Vermehrung des Alkali die Agglutination, eine Verminderung desselben eher die Hämatolyse, ohne daſs man aber, wie auch hier betont werden soll, sagen dürfte, daſs Säuren überhaupt keine Agglutination bewirken würden; denn auch sie können, in richtigem Maſse verwendet, eiweiſsartige Stoffe zum Quellen bringen, in eine mehr oder weniger klebrige Masse verwandeln, so daſs sie, betreffend den Zentrifugenrückstand, das Bild der Agglutination bieten.

Folgende kleine Tabelle, welche sich auf einen Versuch mit Schweineblutkörperchen-Emulsion und gegen Schweineblutkörperchen immunisiertes inaktiviertes Lapin-Immunserum bezieht, mag die Wirkung steigender Mengen von $\frac{n}{100}$ H Cl (in physiologischer Na Cl-Lösung) beleuchten:

Blutkörp.-Emulsion	Serum	$\frac{n}{100}$ H Cl	0,9% Na Cl-Lösung	Beobachtete Wirkung	
ccm	ccm	ccm	ccm	Agglutination	Hämatolyse
2,0	0,5	2,0	1,5	stark	0
2,0	0,5	2,5	1,0	schwächer	Spuren
2,0	0,5	3,0	0,5	sehr schwach	stärker
2,0	0,5	3,5	0,0	sehr schwach	noch stärker

Was die Wirkung der Alkalien betrifft, so geht dieselbe soweit, daſs, wie im nachfolgenden gezeigt werden soll, eine entsprechende Menge von Alkali hämatolytisches Immunserum auch vollständig zu inaktivieren vermag unter Erhaltung des Agglutinationsvermögens.

Folgende Versuchsreihe mit Serum von Lapins, welche gegen Schweineblutkörperchen immunisiert worden waren, und 5proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion, bei Anwendung von $\frac{n}{100}$Natronlauge, welche mit physiologischer Kochsalzlösung bereitet war, soll das Gesagte erhärten:

Proberöhre	Blutkörperchen-Emulsion	aktives Immunser.	NaOH	phys. NaCl
I.	2 ccm	+ 0,5 ccm	+ 0,00 $\frac{n}{100}$	+ 2,9 ccm
II.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,0 ccm	+ 0,9 »
III.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,1 »	+ 0,8 »
IV.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,2 »	+ 0,7 »
V.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,3 »	+ 0,6 »
VI.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,4 »	+ 0,5 »
VII.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,5 »	+ 0,4 »
VIII.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,6 »	+ 0,3 »
IX.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,7 »	+ 0,2 »
X.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,8 »	+ 0,1 »
XI.	2 »	+ 0,5 »	+ 2,9 »	+ 0,0 »

Nach $^3/_4$stündigem Stehen im Thermostaten sämtlich gleichzeitig zentrifugiert. Die Rückstände bilden überall agglutinierte Massen.

Die klar abgegossenen Flüssigkeiten zeigen folgendes:

I. (aktives Serum ohne NaOH) blutrote Flüssigkeit.

II. kaum gefärbt, ganz schwacher rosenroter Stich.

III., IV., V., VI. } II. sehr ähnlich, kaum zu unterscheiden.

VII., VIII., IX., X., XI. } stufenweise ansteigende Rotfärbung, XI. am stärksten rot, aber noch immer bedeutend schwächer als I.

Hämoglobinbestimmungen, ausgeführt mit dem Fleischl-Miecherschen Apparat:

I. = 113,0 (Immunserum ohne NaOH).
II. = 8,6 (» + 2 ccm $\frac{n}{100}$ NaOH)
VI. = 9,8 (» + 2,4 » » »)
XI. = 20,0 (» + 2,9 » » »)

Aus diesem Versuche ergibt sich also folgendes:

Durch Vermehrung des Gehaltes an freiem Alkali kann aktives hämatolytisches Immunserum (Lapin gegen Schweineblutkörperchen immunisiert) vollkommen inaktiviert werden.

In diesem Falle genügten für 0,5 ccm 2 ccm $\frac{n}{100}$ NaOH in physiologischer NaCl-Lösung. Eine weitere Vermehrung des letzteren bewirkt zunächst keine wesentliche Änderung; steigt aber die Menge freien Alkalis über eine gewisse Grenze, welche in diesem Versuch bei etwa 2,4 ccm $\frac{n}{100}$ NaOH liegt, so tritt wieder, wenn auch schwache, doch fortwährend stärker werdende Hämatolyse auf, weil nun schon die eigene hämatolytische Wirkung des freien Alkalis zur Geltung kommt.[1])

Nun wollte ich noch erfahren, ob der Zusatz von Alkali nicht etwa darum die hämatolytische Wirkung des aktiven Immunserums vernichtete, weil es vielleicht ein hämatolytisches Komplement (Alexin) vernichtet hat. War solches der Fall, so war zu erwarten, dafs es nicht mehr gelingen wird, das durch Alkali inaktivierte Serum durch genaue Neutralisation des zugesetzten Alkalis wieder aktiv zu

---

[1]) Die Wirkung von Natronlauge, wenn sie auf Blutkörperchen-Emulsion allein wirkt, mag folgende kleine Tabelle illustrieren:

Blutkörperchen-Emulsion	$\frac{n}{100}$ NaOH in phys. NaCl-Lösung
I. 20 Tropfen	2 Tropfen
II. 20 »	4 »
III. 20 »	6 »
IV. 20 »	8 »

Nach gleich langem Stehen im Thermostaten abzentrifugiert:

I. kaum gefärbt.
II. rötliche Färbung.
III. stärkere Färbung als in II.
IV. stark, blutrot.

Sämtliche Zentrifugenrückstände zeigen Agglutination.

machen. **Der Versuch hat aber das Gegenteil erwiesen: durch genaue Neutralisation kann das durch Alkali inaktivierte Serum wieder genau so aktiv gemacht werden, wie es das aktive Serum selbst war.**

Folgender Versuch mag das soeben mitgeteilte beweisen:

In drei Eprouvetten kamen je 0,5 ccm des schon öfters erwähnten aktiven Serumgemisches (5 Teile Lapinimmunserum, 3 Teile norm. Schweineblutserum); eine Portion erhielt keinen weiteren Zusatz, da sie zur Bestimmung der hämatolytischen Wirkung des unveränderten aktiven Serums diente, die andere wurde mit 2 ccm $\frac{n}{100}$ NaOH in physiologischer NaCl-Lösung versetzt, die dritte aber, nachdem sie mit derselben Menge $\frac{n}{100}$ NaOH in physiologischer NaCl-Lösung versetzt, also inaktiviert wurde, erhielt einen weiteren Zusatz von 1,8 ccm einer annähernd $\frac{n}{100}$ Salzsäure in physiologischer NaCl-Lösung, da ein vorausgegangener Versuch gezeigt hatte, dafs die Salzsäure etwas stärker als $\frac{n}{100}$ war und dafs eben 1,8 ccm notwendig waren, um 2 ccm $\frac{n}{100}$ NaOH zu neutralisieren.

Jede der drei Eprouvetten erhielt die gleiche Menge 5proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion (2 ccm), schliefslich wurden alle drei Mischungen mit physiologischer NaCl-Lösung auf das gleiche Volumen gebracht, durchgeschüttelt und $^3/_4$ Stunden lang im Thermostaten stehen gelassen.

Proberöhre	Blutkörperchen-Emulsion	aktives Immunser.	$\frac{n}{100}$ NaOH	
I.	2 ccm	+ 0,5 ccm	+ 2 ccm	+ 1,8 ccm HCl
II.	2 »	+ 0,5 »	+ 2 »	+ 3,8 » phys. NaCl
III.	2 »	+ 0,5 »	+ 0	+ 1,8 » » »

Nach dem Zentrifugieren wurde klar abgegossen.

I. und III. schienen fast gleich stark rot gefärbt, aber III. doch etwas stärker, was auch die kolorimetrische Bestimmung erwies.

II. war fast ungefärbt, nur leichter rötlicher Schimmer.

Die kolorimetrische Bestimmung, wie früher beschrieben ausgeführt, ergab in Skalenteilen des Hämometers ausgedrückt:

für I. 67 }
» III. 77 } im Mittel aus 10 Ablesungen.

Man sieht also, dafs durch Neutralisation der Alkalimenge, welche vollständige Inaktivierung hervorruft, die hämatolytische

Wirkung des Serums wieder hergestellt werden kann. Das Komplement wird nicht vernichtet.

Es ist also erwiesen, dafs die Aktivität des hämatolytischen Serums durch Zusatz von Alkali aufgehoben, durch Neutralisation des letzteren aber wieder hergestellt werden kann, und wir haben in diesem ganzen Verhalten in der Tat eine weitere Stütze für die Annahme, dafs der Immunkörper ein säureartiger Körper ist.

Über Hämagglutination und Hämatolyse.

VI. Uber die Änderung der Hydroxyl-Ionen-Konzentration beim Inaktivieren der Sera. Einflufs derselben auf die Hämatolyse.

Von

L. und P. v. Liebermann.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Budapest.)

Nach den in vorstehender Arbeit mitgeteilten Beobachtungen drängte sich die Frage auf, ob denn die Aktivität eines hämatolytischen Serums nicht etwa ausschliefslich dem sog. Immunkörper zuzuschreiben wäre, der, je nach dem gröfseren oder geringeren Gehalt des Serums an freiem Alkali, einmal die Rolle eines Agglutinins, ein andermal diejenige eines Hämolysins spielen könnte; kurz gesagt: ob es möglich ist, dafs eine Verminderung der OH-Ionenkonzentration das Hinzukommen eines Komplementes vortäuscht?

Es war zunächst zu untersuchen, ob die durch Erwärmen auf 56° bewirkte Inaktivierung mit einer Änderung der OH-Ionenkonzentration einhergeht in dem Sinne, dafs die Alkalizität gesteigert wird, ob also auch diese Art der Inaktivierung auf dieselbe Ursache zurückzuführen wäre, wie die durch direkten Alkalizusatz bewirkte?

Unsere in dieser Richtung geführten Untersuchungen haben zunächst ergeben, dafs die wirkliche Alkalizität der Sera, also ihre Hydroxyl-Ionenkonzentration, durch ½-stündiges Erhitzen auf 56° in der Tat wesentlich gesteigert wird, und zwar ebenso

die der Immunsera (von gegen Schweineblutkörperchen immunisierten Lapins) als die der von uns untersuchten Normalsera von Kaninchen, Schwein und Pferd. Wir führen einige dieser, nach der elektrometrischen Methode[1]) gewonnenen Resultate vor, schon darum, um über die Gröfsenordnung dieser Änderungen einen Begriff zu geben:

	Konzentration der OH-Ionen g-Äquivalente pro l
Immunserum I	10. 10^{-7}
Dasselbe bei 56° inaktiviert . .	26. 10^{-7}
Immunserum II mit phys. NaCl dreifach verdünnt	3,4. 10^{-7}
Dasselbe bei 56° inaktiviert . .	9,1. 10^{-7}

Folgender Versuch zeigt, dafs auch Normalserum auf 56° erhitzt ähnliche Änderungen erfährt:

	$C_{OH'}$
Normales Pferdeblutserum . .	4,3. 10^{-7}
Dasselbe auf 56° erhitzt . . .	9,2. 10^{-7}

Bestimmungen, welche auf unsere Bitte Herr Prof. Tangl mit anderen Seris die Güte hatte auszuführen, ergaben qualitativ dasselbe Resultat, wenn auch die Differenzen geringer waren, wie aus folgender kleinen Tabelle ersichtlich ist:

	$C_{OH'}$
Lapin-Immunserum	3,8. 10^{-7}
Dasselbe auf 56° erhitzt . . .	5,1. 10^{-7}
Lapin-Normalserum	2,7. 10^{-7}
Dasselbe auf 56° erhitzt . . .	3,2. 10^{-7}

[1]) Bekanntlich wird nach dieser Methode unter Anwendung von unpolarisierbaren Wasserstoff-Elektroden, die elektromotorische Kraft einer Kette bestimmt, welche einerseits aus $\frac{n}{100}$ Salzsäure (bereitet mit $\frac{n}{8}$ NaCl-Lösung), anderseits aus dem zu untersuchenden Serum besteht, welche beide Flüssigkeiten durch eine mit $\frac{n}{8}$ NaCl-Lösung gefüllte Kapillarröhre miteinander in Verbindung gebracht werden (Ausführliches siehe z. B. bei H. J. Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre etc. Wiesbaden 1902—1904.)

Es mag hier erwähnt werden, dafs die Menge des titrierbaren Alkali durch Erhitzen des Serums keine Anderung erfährt:[1])

	Verbrauchte ccm $\frac{n}{10}$ Säure auf 100 ccm Serum berechnet
Aktives Immunserum	43
Dasselbe inaktiviert	44
Normalserum	32
Dasselbe inaktiviert	32

Nach alldem schien also unsere Vermutung, dafs beim Inaktivieren durch Erhitzen die Alkalizität der Sera gesteigert wird, bestätigt, und es schien der Schlufs gestattet, dafs die Einbufse an hämatolytischer Kraft, welche die erhitzten Sera erleiden, der vermehrten Alkalizität zuzuschreiben wäre, da wir ja gesehen hatten, dafs eine Inaktivierung auch durch Alkalizusatz zu erreichen ist, ja, da wir ja eben durch diese Beobachtung zu den soeben mitgeteilten Versuchen geführt wurden.

Trotzdem wäre aber letzterer Schlufs voreilig gewesen.

Als wir nämlich die Stichhaltigkeit eines solchen Schlusses einer weiteren experimentellen Prüfung unterzogen, hat es sich herausgestellt, dafs eine zur Inaktivierung führende Vermehrung der Hydroxylionen durch Zusatz von Alkali von ganz anderer Gröfsenordnung ist, als die, die durch Erhitzen der Sera auf 56° zu erzielen ist. In dem Versuche, dessen Resultat wir nachstehend mitteilen, war die Vermehrung der OH-Ionenkonzentration bei Zusatz von 5 ccm $\frac{n}{100}$ Kalilauge zu 1 ccm für Schweineblutkörperchen aktiven Lapinimmunserum, welche Menge eben ausreichend war, um es fast zu inaktivieren, etwa 19mal gröfser, als jene des durch Erhitzen inaktivierten Serums.

[1]) Diese Bestimmungen rühren auch von Herrn Prof. Tangl her. Angewendet wurde $\frac{n}{10}$ HCl und Lakmoidpapier als Indikator.

	OH' Grammaequivalente im Liter
1 ccm aktives Immunserum + 2 ccm $\frac{n}{100}$ Kalilauge in 0,9 proz. NaCl-Lösung	170. 10^{-7}
1 ccm aktives Immunserum + 2 ccm 0,9 proz. NaCl Lösung	3,4. 10^{-7}
1 ccm bei 56° inaktiviertes Immunserum + 2 ccm 0,9 proz. NaCl-Lösung	9. 10^{-7}

Wenn es also auch erwiesen ist, dafs die wahre Alkalizität des Serums beim Erhitzen auf 56° beträchtlich ansteigt, und wenn es auch möglich ist, dafs dieses Ansteigen bei der Inaktivierung eine gewisse Rolle spielt, so ist diese bei unseren Versuchen nur gering anzuschlagen. Die Inaktivierung mufs andere, wichtigere Ursachen haben.

Diesen Schlufs rechtfertigen auch andere, gleichfalls zur Klarstellung der etwaigen Rolle der vermehrten Alkalizität von uns ausgeführte, im folgenden mitgeteilte Versuche.

Es lag nahe, den Versuch zu machen, das inaktivierte Immunserum durch Herabsetzung der Alkalizität, durch Zusatz von Säure wieder zu aktivieren, wobei natürlich saure Reaktion vermieden werden mufste und auch vermieden wurde. Wir haben Kohlensäure und Salzsäure verwendet.

Es sei zunächst ein Versuch mit Kohlensäure mitgeteilt.

Schweineblutkörperchen lösendes Kaninchenimmunserum wurde in 3 Portionen geteilt; eine blieb unverändert, die andere wurde bei 56° inaktiviert, die dritte ebenfalls inaktiviert, aber nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde in dieselbe etwa 20 Minuten lang gewaschenes Kohlendioxyd eingeleitet.

8 Eprouvetten wurden nun auf folgende Weise beschickt:

I.	10 Tropfen Schweineblutkörperchen-Emulsion	+ 4 Tropfen inaktives Immunserum.
II.		+ 4 » » »
III.		+ 4 » » » mit CO_2 behandelt.
IV.		+ 4 » » » » » »
V.		+ 4 » aktives Immunserum.
VI.		+ 4 » » »
VII.		+ 4 » physiol. NaCl-Lösung.
VIII.		+ 4 » » » »

Also überall je zwei sich kontrollierende Versuche. V—VIII waren Vergleichs- resp. Kontrollröhrchen. Sämtliche blieben nach dem Durchschütteln gleich lang (etwa 1 Stunde) im Thermostaten bei 37^{0}, wurden dann zentrifugiert und abgegossene Flüssigkeit sowie Zentrifugenrückstand untersucht.

Resultate.

I., II. ganz gleich, starke Agglutination, schwache Hämatolyse.
III., IV. ganz gleich, Agglutination, bedeutend stärkere Hämatolyse.
V., VI. ganz gleich, schwache Agglutination, sehr starke Hämatolyse.
VII., VIII. ganz gleich, schwache rötliche Färbung der Lösung.

Die quantitativen Hämoglobinbestimmungen, ausgeführt wie bei den vorstehenden Ricinversuchen, ergaben:

für Lösung	I und	II = 52		der Fleischlschen Hämometer-Skala.
»	» III »	IV = 62		
»	» V »	VI = über 120		
»	» VII »	VIII = 17		

Ein anderer Versuch mit längerem Einleiten von CO_2 ergab ungefähr das nämliche.

Es gelingt also, das inaktivierte Immunserum durch Einleiten von CO_2 teilweise zu reaktivieren. Aber eine dem aktiven Immunserum auch nur annähernd gleiche hämatolytische Wirkung ist mit Kohlensäure nicht zu erzielen.

Der Gedanke, dafs die Veränderung des Immunserums beim Erwärmen auf 56^{0} etwa durch Entweichen von Kohlendioxyd zu erklären wäre, ist also von der Hand zu weisen. Übrigens lehrten auch direkte Versuche, dafs auch beim Erhitzen bis zur Koagulation nur sehr wenig CO_2 entweicht.

Auch Versuche mit einer starken Säure, der Salzsäure, haben ein qualitativ ähnliches Resultat ergeben, denn es gelingt allerdings durch Zusatz von Salzsäure (oder auch von anderen starken Säuren, wie z. B. Schwefelsäure) zu einem durch Erwärmen inaktivierten Immunserum demselben hämatolytische Eigenschaft zu geben, verwendet man aber so viel Säure als nötig ist, um denselben Grad von Hämatolyse zu erreichen, welchen das aktive (nicht erhitzte) Immunserum bewirkt, so findet man, dafs der Alkaligehalt des mit

Säure versetzten Serums schon so beträchtlich abgenommen hat, dafs es nicht mehr entschieden alkalisch, sondern schon amphoter reagiert und dafs an der schon etwas bräunlichen Färbung der hämatolysierten Flüssigkeit eine Säurewirkung (Methämoglobinbildung) deutlich zu erkennen ist.

Die zu den Versuchen dienenden Sera wurden aus einem Gemisch von gegen Schweineblutkörperchen immunisiertem Lapinimmunserum und normalem Schweineblutserum im Verhältnisse von 5 : 3 hergestellt. Es geschah dies darum, weil das Serum unserer hochimmunisierten Kaninchen zwar reich an Immunkörper, aber schon arm an Komplement geworden war und für sich allein nur mehr sehr schwach hämatolytisch wirkte. Ein Teil wurde bei 56° inaktiviert, ein anderer Teil als aktives Serum verwendet. Nach ³/₄ stündigem Stehen im Thermostaten (bei 37°), während welcher Zeit einmal durchgeschüttelt wurde, wurden die Proberöhren herausgenommen, gleichzeitig zentrifugiert, die Flüssigkeiten klar abgegossen und diese miteinander kolorimetrisch oder auch durch einfache Inspektion verglichen.

Der Schlufs einer solchen längeren Versuchsreihe mit steigenden Mengen von $\frac{n}{100}$ HCl und dementsprechend steigender Hämatolyse war folgender:

Proberöhre I. 2 ccm Schweineblutkörperchen-Emulsion + 0,5 ccm inaktives Immunserum + 3,5 ccm $\frac{n}{100}$ HCl.

Proberöhre II. 2 ccm Schweineblutkörperchen-Emulsion + 0,5 ccm aktives Immunserum + 3,5 ccm phys. NaCl.

Serum I reagiert amphoter, Serum II stark alkalisch. Nach ³/₄ stündigem Stehen im Thermostaten zentrifugiert. Die abgegossenen Flüssigkeiten gleich stark hämatolysiert und beinahe gleicher Farbennuance, doch hatte Flüssigkeit I schon einen leisen Stich ins Bräunliche. Die Zentrifugenrückstände waren gleich, sowohl was ihre Menge als ihr Aussehen anbelangt (I etwas bräunlicher gefärbt), und bestanden aus roten, agglutinierten Blutkörperchenklumpen.

Der Hämoglobingehalt der beiden Flüssigkeiten, ausgedrückt in Graden des Fleischlschen Hämometers, war im Mittel aus 10 miteinander gut übereinstimmenden Ablesungen folgender:

$$I = 49, \; II = 44.$$

Die verwendeten 3,5 ccm $\frac{n}{100}$ HCl hatten also 0,5 ccm inaktiviertes Immunserum allerdings vollständig reaktiviert, aber unter den schon erwähnten Begleiterscheinungen, die nicht gestatten, eine Identität mit der hämatolytischen Wirkung des aktiven Serums anzunehmen,

Das Resultat der soeben mitgeteilten Versuche ist also folgendes:

Obwohl die OH-Ionenkonzentration der Immunsera beim Inaktivieren durch Erwärmen eine wesentliche Steigerung erfährt, so ist es doch nicht diese, welche die Inaktivierung bewirkt. Sie kann höchstens eine untergeordnete Rolle spielen: Eine Verminderung der OH-Ionenkonzentration (oder eine Steigerung der H-Ionenkonzentration) bei einem noch zulässigen Grad bewirkt allerdings verstärkte Hämatolyse; diese ist aber, falls die Sera nicht schon beinahe sauer reagieren, nie so bedeutend, wie die, die ein aktives hämatolytisches Serum bewirkt.

Die eingangs dieser Mitteilung erwähnte Annahme wäre also falsch, und es mufs daher in der Tat nach einem Körper (Komplement) gesucht werden, welcher im Verein mit dem Immunkörper die Hämatolyse hervorruft.

Über Hämagglutination und Hämatolyse.

VII. Über Nachweis und Isolierung des hämatolytischen Immunkörpers.

Von

L. v. Liebermann und **B. v. Fenyvessy.**

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Budapest.)

In einer früheren Mitteilung (s. oben) wurde darauf hingewiesen, dafs durch Behandeln von — durch Zusatz eines inaktivierten Immunserums — agglutinierten Schweineblutkörperchen mit $^{n}/_{100}$ HCl eine Lösung erhalten wird, welche nach genauer Neutralisation Schweineblutkörperchen zu agglutinieren vermag.[1]) Da Kontrollversuche, in welchen Schweineblutkörperchen anstatt eines Immunserums mit inaktiviertem Schweineblutserum behandelt wurden, sonst aber ganz ähnlich vorgegangen wurde, keine agglutinierenden Extrakte lieferten, konnte nicht daran gezweifelt werden, dafs mit Hilfe von Salzsäure das an die Blutkörperchen gebundene Agglutinin frei gemacht werden kann. Eine Auflösung der Blutkörperchen bei Zusatz von Normalserum stellte sich aber in diesen ersten Versuchen entweder gar nicht oder doch ganz undeutlich ein. Der Umstand, dafs das Salzsäureextrakt mit Immunserum behandelter Blutkörperchen wohl agglutinierende, jedoch — selbst in Gegenwart eines komplementhaltigen Serums — keine hämatolytischen Eigen-

---

1) In ähnlicher Weise haben mit $\frac{n}{100}$ NaOH und H_2SO_4 Hahn und Trommsdorff das Typhus- und Cholera-Agglutinin abgespalten. Münch. med. Wochenschr. 1900, Nr. 13.

schaften aufweist, wäre selbst dann auffällig gewesen, wenn wir an der Identität des Agglutinins und des hämatolytischen Immunkörpers hätten zweifeln wollen. Es lag näher, den Grund für das Ausbleiben der Hämatolyse in den ungünstigen Versuchsbedingungen zu suchen. Es war uns nämlich von früheren Versuchen her bekannt, dafs eine ganz geringfügige Zunahme der Alkalinität der Mischung die Wirksamkeit des Immunkörpers aufzuheben vermag, d. h. dafs zwischen der Menge des Immunkörpers und der Höhe der Alkalinität des Serums ein ganz bestimmtes Verhältnis bestehen mufs, um die Hämatolyse zum Vorschein treten zu lassen. Es war daher zu erwarten, dafs es in einem Versuche, wo ein auf irgend welche Weise isolierter Immunkörper von unbekannter Menge mit Blutserum vermischt wird, rein vom Zufall abhängen wird, ob das erwähnte Gleichgewicht erreicht wird. Die nachstehenden Versuche zeigen, dafs es tatsächlich stets gelingt, den hämatolytischen Immunkörper in dem Salzsäureextrakt der agglutinierten Blutkörperchen nachzuweisen, sobald die Alkalinität des komplementhaltigen Serums eine entsprechende ist, resp. durch Zusatz von Säure entsprechend herabgesetzt wird.

Im folgenden teilen wir die bisherigen Resultate unserer Untersuchungen über den Nachweis und die Isolierung der Immunkörper mit. Wir beschreiben den Gang der Versuche etwas ausführlicher, da das Gelingen der Experimente vom genauen Einhalten der von uns ermittelten Bedingungen abhängt.

Unter »Blutkörperchen-Emulsion« soll wie immer eine 5 proz. Suspension von gewaschenen Schweineblutkörperchen in 0,9 proz. NaCl-Lösung verstanden werden. Stark wirksame hämatolytische Immunsera — und solche sollen verwendet werden — wurden erhalten von kräftigen, 2000—2500 g schweren Kaninchen (Lapins), die mit je 1 ccm, später mit je 2 ccm der erwähnten Emulsion mindestens 5—6 Tage lang subkutan geimpft wurden.

Zur Kontrolle der mit Immunseris angestellten Versuche dienten solche, in denen anstatt des Kaninchenserums Schweineserum verwendet, sonst aber ganz ähnlich vorgegangen wurde.

Die Sera wurden durch halbstündiges Erwärmen bei 56° C inaktiviert und dann mit der doppelten Menge einer Blutkörperchenemulsion gründlich vermengt (es wurden gewöhnlich 3 ccm Serum und 6 ccm Emulsion angewendet). Die Mischung blieb dann $^3/_4$ Stunden lang im Thermostaten. Dann wurden die Blutkörperchen abzentrifugiert und dreimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Nach Abgiefsen der letzten Waschflüssigkeit schritten wir zur Zerlegung der supponierten Stroma-Immunkörperverbindung. Zu diesem Zwecke fügten wir den Blutkörperchen 3 ccm einer $^1/_{100}$ normalen HCl-Lösung zu (letztere enthielt, gleich allen unseren sonstigen Reagentien 0,9% NaCl). Die Mischung wurde etwa 2 Minuten lang geschüttelt, dann abzentrifugiert. Die abgegossene mehr oder minder bräunlich oder rötlich gefärbte Flüssigkeit wurde mit $^1/_{100}$ normaler KOH, bei Anwendung von empfindlichem Lackmuspapier genau neutralisiert, der dabei entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert. Diese nunmehr gewöhnlich nur schwach gefärbte neutrale Lösung diente zum Nachweis des Immunkörpers. Sie wurde mit 2 ccm frischem Schweineblutserum und mit der gleichen Menge Blutkörperchenemulsion gründlich vermischt und auf $^3/_4$ Stunden in den Thermostaten gestellt, dann abzentrifugiert, um in der über den Blutkörperchen stehenden Flüssigkeit das etwaige Austreten von Blutfarbstoff und nach Abgiefsen derselben ein Zusammenkleben der Blutkörperchen beobachten zu können. In den auf diese Weise ausgeführten Versuchen konnte stets die Agglutination der Blutkörperchen festgestellt werden; auch die Hämatolyse trat manchmal ein, doch blieb sie sehr oft aus. Die Kontrollversuche fielen in beiden Richtungen immer negativ aus. Nun suchten wir — unserer anfangs geschilderten Annahme entsprechend, die zu hohe Alkalinität der Serums durch Zusatz von 5—10 Tropfen $^1/_{100}$ normaler HCl auf einen geeigneten Grad herabzusetzen. Es stellte sich aber bald heraus, dafs es durch einzelne Versuche nicht gelingt, den nötigen Säurezusatz ausfindig zu machen.

Wir stellten daher Serienversuche an und suchten das Optimum der Reaktion durch Zusatz von abgestuften Säure-

mengen festzustellen, wobei darauf geachtet wurde, dafs die Mischungen noch alkalisch reagieren.

Wir lassen zwei solche Beispiele folgen. In beiden Fällen wurde der oben beschriebene Vorgang bis zur Neutralisation der Extrakte verfolgt. Wir benutzen folgende Abkürzungen:

K_{56}	=	inaktiviertes Kaninchenserum.
S_{56}	=	» Schweineserum.
S	=	frisches Schweineserum.
Bl	=	5 proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion.
Extr. K_{56}	=	neutr. Extrakt von mit K_{56} behandelten Blutkörperchen.
Extr. S_{56}	=	» » » » S_{56} » »

Versuch I.

1.	Extr. K_{56}	+ 10 Tropfen $^1/_{100}$ norm. HCl	+ 2 ccm S	+ 2 ccm Bl.
2.	» »	+ 15 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
3.	» »	+ 20 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
4.	» »	+ 25 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
5.	» »	+ 30 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
6.	Extr. S_{56}	+ 10 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
7.	» »	+ 15 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
8.	» »	+ 20 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
9.	» »	+ 25 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
10.	» »	+ 30 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »

Die Proben wurden mit 0,9 proz. NaCl-Lösung komplettiert, $^3/_4$ Stunden lang im Thermostaten gehalten, dann zentrifugierten. Resultat: In 6., 7., 8., 9. und 10. keine Agglutination, keine Hämatolyse. In 1., 2., 3., 4. und 5. Agglutination, deutliche, ziemlich gleich starke Hämatolyse.

Dieser Versuch beweist die Anwesenheit des hämatolytischen Immunkörpers im Salzsäureextrakt der durch Immunserum agglutinierten Blutkörperchen. Ein Einflufs der steigenden HCl-Zusätze läfst sich aber hier nicht feststellen. Vielleicht wäre die Hämatolyse auch ohne nachträglichen Säurezusatz eingetreten.

Versuch II.

1.	Extr. K_{56}	+ 10 Tropfen $^1/_{100}$ norm. HCl	+ 2 ccm S	+ 2 ccm Bl.
2.	» »	+ 15 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
3.	» »	+ 20 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
4.	» »	+ 30 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
5.	» »	+ 40 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
6.	Extr. S_{56}	+ 10 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
7.	» »	+ 15 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
8.	» »	+ 20 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
9.	» »	+ 30 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »
10.	» »	+ 40 » » » »	+ 2 » »	+ 2 » »

(Sonstiges Vorgehen wie in Versuch I.)

Resultat: In 6., 7., 8., 9. und 10. keine Agglutination, keine Hämatolyse. In 1., 2., 3., 4. und 5. starke Agglutination, in 2. und 3., starke Hämatolyse, sonst nirgends.

Dieser Versuch zeigt deutlich den Einflufs der Reaktion auf die hämatolytische Wirkung des Immunkörpers. Das Optimum der Alkalinität scheint sich zwischen ganz engen Grenzen zu bewegen. Es wurde bei Zusatz von 15 und 20 Tropfen $^1/_{100}$ normaler HCl erhalten, 10 Tropfen waren zu wenig, 30 und 40 zu viel. Aus den beiden letzten Daten folgt aber, was übrigens durch die Kontrollversuche zur Genüge erwiesen ist, dafs der HCl bei der Auflösung der Blutkörperchen keine direkte, sondern nur eine indirekte Rolle zukommt, indem sie die Reaktion der Mischung auf die nötige Höhe einstellt.

Nachdem wir uns darüber klar geworden waren, dafs der Immunkörper im Salzsäureextrakt[1]) enthalten ist, stellten wir uns die Aufgabe, den Immunkörper weiter zu isolieren, resp. ihn womöglich in reinem Zustande darzustellen.

Zum Ausgang dienten uns auch diesmal die in der obigen Weise mit dem Immunkörper beladenen Schweineblutkörperchen. Auch wurden dieselben Prozeduren gleichzeitig mit Schweineblutserum zur Kontrolle durchgeführt.

Die vom Serum abzentrifugierten und dreimal gewaschenen Blutkörperchen wurden mit 10 ccm $^1/_{100}$ normaler HCl versetzt, nach 2 bis 3 Minuten in den Scheidetrichter gebracht und mit erneuerten Äthermengen dreimal ausgeschüttelt. Um die Trennung der Schichten zu fördern, wurde in die saure Flüssigkeit NaCl bis zur Sättigung eingetragen. Die durch trockene Filter filtrierten Ätherauszüge wurden vereinigt und verdunstet. Der Rückstand war stark gefärbt (Ätherextrakt). Die saure Flüssigkeit brachten wir in eine Abdampfschale, versetzten sie mit $^1/_{100}$ normaler Na_2CO_3-Lösung bis zur schwach alkalischen Reaktion und verdampften sie auf dem Wasserbade. Den trockenen Rückstand brachten wir möglichst vollständig in eine Kochflasche und kochten ihn auf dem Wasserbade am Rückflufs-

---

[1]) Wir haben in einigen Versuchen auch eine $^1/_{100}$ norm. H_2SO_4 zur Extraktion angewendet.

kühler mit dreimal erneuertem absolutem Alkohol, je eine Stunde lang. Die filtrierten braunen Extrakte wurden vereinigt, der Alkohol auf dem Wasserbade verjagt. (Roher alkoholischer Extrakt.) Diese beiden (ätherischen und alkoholischen) Extraktrückstände sowie die in heifsem Alkohol unlöslichen Substanzen lösten resp. suspendierten wir in 2—3 ccm 0,9 proz. NaCl-Lösung, fügten je 2 ccm **S** und **Bl.** hinzu und verfuhren sonst, wie früher beschrieben wurde. — Es ist hier am Platze zu erwähnen, dafs man in Fällen, wo es sich schon von vornherein um bräunlich gefärbte Flüssigkeit handelt, die eine genaue Beobachtung einer etwaigen geringfügigen Hämatolyse vereiteln, zweckmäfsig verfährt, wenn man nach dem ersten $^3/_4$ stündigen Versuch die gefärbte Flüssigkeit von den abzentrifugierten Blutkörperchen abgiefst, letztere mit frischem, hellem **S** versetzt und die Probe wieder in den Thermostaten stellt.

Durch viele Versuche liefs es sich feststellen, dafs von den genannten drei Extraktionsprodukten weder im Ätherextrakt, noch in den in heifsem Alkohol unlöslichen Anteilen, wohl aber im (rohen) alkoholischen Extrakte der hämatolytische Immunkörper enthalten ist. In diesem trockenen Rückstand lassen sich (neben wenig unorganischer Substanz) zwei verschiedene Substanzen unterscheiden. Die eine ist braun, schmierig, in Wasser (0,9 proz. NaCl) fast gar nicht, in kaltem Alkohol leicht löslich; sie besitzt keine hämatolytischen Eigenschaften. Die zweite Substanz ist ebenfalls bräunlich, sandartig, in Wasser leicht, in kaltem Alkohol schwer löslich. Diese wirkt, in 0,9 proz. NaCl gelöst und filtriert nach Zusatz von **S** und **Bl** deutlich hämatolytisch.

So weit sind unsere Isolierungsversuche bisher gediehen. Wir sind gegenwärtig mit der Darstellung und weiteren Reinigung dieser wasserlöslichen Substanz beschäftigt.

Über Hämagglutination und Hämatolyse.

VIII. Über hämatolytische Komplemente und über den Mechanismus der Wirkung hämatolytischer Sera.

Von

L. v. Liebermann.

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Budapest.)

Meine Versuche über die Wirkungsweise der hämatolytischen Kaninchensera auf Schweineblutkörperchen hatten ergeben, dafs das in ihnen befindliche Agglutinin nicht genügt, um ihre bedeutende hämatolytische Wirkung zu erklären. Entsprechend den auch bisher gültigen Anschauungen ist also zum Zustandekommen der Hämatolyse noch mindestens ein zweiter Körper nötig.

Bei der Suche nach diesem Körper dachte ich natürlich zunächst an das Lecithin, da Kyes, sowie später auch Sachs[1]) gefunden hatten, dafs es bei Kobragift die Rolle eines Komplementes spielt. Ich mufste mich aber alsbald überzeugen, dafs bei meinen hämatolytischen Kaninchenseris das Lecithin, wenigstens das aus Eidotter bereitete, nicht in dieser Weise wirkt, denn eine Lecithin-Emulsion in physiologischer NaCl-Lösung, welche schon für sich stark hämatolytisch wirkte, büfst diese Wirkung vollständig ein, wenn man es in derselben Menge inaktiviertem Kaninchenserum zusetzt. Auch sein Spaltungsprodukt, das Neurin, verliert viel von seiner hämatolytischen Kraft, wenn

---

[1]) Preston Kyes und Kyes und Sachs, gesammelte Arbeiten über Immunitätsforschung von P. Ehrlich.

es mit inaktiviertem Immunserum gemengt wird. Ich übergehe die nähere Beschreibung dieser negativen Versuche und bemerke nur, daſs die Befunde von Kyes und Sachs der Annahme einer Vielheit der Komplemente günstig sind, unter denen auch verschiedene Lecithine vorkommen und, je nach ihrer Natur verschiedene Wirkungen entfalten können.

Nachdem ich durch eigene Versuche festgestellt hatte, daſs das Komplement kein flüchtiger Körper ist — (es wurde aktives Serum destilliert und das Destillat in bei 56° inaktiviertem Immunserum aufgefangen, wodurch dieses nicht reaktiviert wurde) — versuchte ich, ob die Sera, welche ja meistens trübe sind oder opalisieren, bei Filtration eine Veränderung erleiden. In der Tat gelang es einigemal, aktives Immunserum durch öfteres Filtrieren durch schwedisches Filtrierpapier inaktiv zu machen und durch Herunterspülen des auf dem Filter gar nicht sichtbaren Rückstandes mit dem inaktivierten Serum (bei durchstoſsenem Filter) dieses wieder zu reaktivieren.

Es gelang also mitunter, das Komplement abzufiltrieren. Meistens gelingt dies aber nicht. Immunsera, welche bei 56° inaktiviert werden, trüben sich ziemlich stark, und man sieht in der Flüssigkeit zahlreiche, stark lichtbrechende Flitter schwimmen. Filtriert man, so bleiben schon merkliche Rückstände, in welchen ich neben höheren Fettsäuren Kalk gefunden habe.

Die Rückstände wurden (mitsamt dem Filter) mit verdünnter Salzsäure erwärmt, die Flüssigkeit abgegossen und mit Äther ausgeschüttelt. Dieser hinterlieſs nach dem Verdunsten einen kristallisierten Rückstand, welcher den Margarinkristallen sehr ähnlich war. Er löste sich leicht in Alkohol und in verdünnter Sodalösung. Letztere trübte sich beim Ansäuern.

Die vom Äther getrennte Salzsäurelösung gibt mit Ammoniak und oxalsaurem Ammoniak starke Trübung.

Diese Beobachtung führe ich nur aus dem Grunde an, weil sie es war, die mich zuerst dazu gebracht hat, meine Aufmerksamkeit den in den Seris vorkommenden Fettsäuren und Seifen zuzuwenden.

Es ist längst bekannt, dafs im Blute Seifen als normale Bestandteile vorkommen, auch wufste man, dafs die Seifen rote Blutkörperchen zerstören, also hämatolytisch wirken, und doch schenkte man diesen Thatsachen keine besondere Beachtung.

Ich mufste mich fragen: wie kommt es, dafs diese Seifen des Blutserums die Blutkörperchen nicht zerstören? Der Gedanke, dafs das Serum zu wenig Seife enthielte, war zurückzuweisen, denn ich sah, dafs schon 0,25 ccm einer 1 ‰ Lösung von Medizinalseife 2 ccm 5proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion in ganz kurzer Zeit (etwa einer Viertelstunde) vollständig zu hämolysieren vermag, bei einem Gesamtvolumen der Mischung von etwa 5 ccm, so also, dafs diese etwa 0,00025 ccm Seife enthält, was nur 5 Tausendstel Prozenten entspricht!

Offenbar sind also im Serum Stoffe vorhanden, welche die Blutkörperchen gegen die Wirkung der Seifen schützen.

Ich erkannte sehr bald, dafs schon dem Serumalbumin allein eine solche schützende Kraft zukommt, ja dafs dies eine Eigenschaft der Eiweifskörper überhaupt sein dürfte, da auch Hühnereiweifs eine ähnliche Wirkung ausübt.

Ich führe als Beispiel folgende, gröfseren Reihen entnommenen zwei Versuche an:

1. Serumalbumin in phys. NaCl bis zur Sättigung gelöst und filtriert (A). Medizinalseife in phys. NaCl-Lösung (1 : 1000) (B). 5proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion in phys. NaCl mit gewaschenen Blutkörperchen bereitet (C).

I. 0,25 ccm B + 2 ccm A + 2 ccm C + 0,45 ccm phys. NaCl.
II. 0,25 » B + 0 + 2 » C + 2,45 » » »

Nach 20 Minuten langem Stehen im Thermostaten zentrifugiert: II. sehr stark hämatolysiert; I. keine Spur von Hämatolyse.

2. Mit Eieralbuminlösung, bereitet, wie die Lösung von Serumalbumin (D).

I. 0,5 ccm B + 1 ccm D + 2 ccm C + 0
II. 0,5 » B + 0 + 2 » C + 1 ccm phys. NaCl.

II.: starke Hämatolyse. I.: sehr schwache Hämatolyse.

Ähnlich den erwähnten Eiweifskörpern wirken auch Kalksalze, wie folgender Versuch zeigt:

1. 0,1 ccm Seifenlös. (B) + 0,5 ccm 1% $CaCl_2$ in phys. NaCl + 2 ccm Blutk.-Emuls.
2. 0,1 » » » + 0 + 2 » »

Nach $^1/_2$ stündigem Stehen im Thermostaten:

1. Keine Spur von Hämatolyse.
2. Vollständig hämatolysiert.

Es mag erwähnt werden, dafs auch Magnesiumsalze eine ähnliche, wenn auch etwas schwächere Wirkung entfalten.

Durch $CaCl_2$ inaktivierte Seifenlösung kann mit kalkentziehenden Mitteln, z. B. mit oxalsaurem Ammonium wieder reaktiviert werden.

Folgender Versuch mit 1 proz. Ammoniumaxalatlösung O. A., mit physiologischer NaCl-Lösung bereitet, beweist dies:

1.	0,1 ccm Seifenlösung	+ 0	+ 0	+ 1,5 ccm phys. NaCl
2.	0,1 » »	+ 0,5 ccm $CaCl_2$	+ 0	+ 1,0 » » »
3.	0,1 » »	+ 0,5 » »	+ 0,5 O. A.	+ 0,5 » » »
4.	0,1 » »	+ 0,5 » »	+ 1,0 »	+ 0 » »
5.	0,1 » »	+ 0	+ 0,5 »	+ 1,5 » » »
6.	0,1 » »	+ 0	+ 1,0 »	+ 0,5 » » »
7.	0 » »	+ 0	+ 0,5 »	+ 1,6 » » »
8.	0 » »	+ 0	+ 1,0 »	+ 0,6 » » »

Nach halbstündigem Stehen im Thermostaten:

1. = schwache Hämatolyse.
2. = keine Spur.
3. = vollständige Hämatolyse.
4. = » »
5. = Spuren von Hämatolyse.
6. = » » »
7. = keine Spur von Hämatolyse.
8. = » » » »

Es ist hier aufser dem reaktivierenden Einflufs auch noch zu erkennen, dafs das oxalsaure Ammonium die Wirkung der Natronseife befördert, wahrscheinlich infolge einer Umsetzung.

Andere Versuche, bei denen $CaCO_3$ und $Ca_3(PO_4)_2$ den Seifenlösungen in Pulverform zugesetzt wurden, haben ergeben, dafs ausgiebige Inaktivierung erst beim Erhitzen eintritt, und dafs auch hier die entsprechenden Magnesiumverbindungen weniger wirksam sind. Dafs es sich in allen diesen Fällen um eine Bildung von schwerlöslichen und minder wirksamen Kalkseifen handelt, liegt auf der Hand.

Genau so wie Seifenlösungen werden nun auch die aktiven hämatolytischen Kaninchenimmunsera und Schweineblutserum von Kalziumchlorid (1 proz. mit physiologischer Kochsalzlösung bereitete Lösung) inaktiviert. Zu folgendem Versuch diente ein Gemenge aus gleichen Teilen Kaninchenimmunserum und Schweineblutserum.

1.	1 ccm Serum	+ 1 ccm $CaCl_2$	+ 2 ccm Schweineblut-Em.	+ 1 ccm phys. NaCl.
2.	1 » »	+ 2 » »	+ 2 » »	+ θ
3.	1 » »	+ θ	+ 2 » »	+ 2 ccm phys. NaCl.

Nach halbstündigem Stehen im Thermostaten:

1. Spuren von Hämatolyse.
2. Keine Spur von Hämatolyse.
3. Vollständig hämatolysiert.

Die Ursache dieser inaktivierenden Wirkung ist offenbar auch hier die, dafs das Kalksalz das im Serum vorhandene fettsaure Alkali in die unwirksame und schwerlösliche Kalkverbindung überführt.

Auch hier gelingt es, das hämatolytische Vermögen durch Zusatz von oxalsaurem Ammonium wieder herzustellen, doch ist ein quantitativer Vergleich schwierig, weil nach Zusatz von oxalsaurem Ammonium zum Serum eine dichte, nicht filtrierbare und auch beim Zentrifugieren sich nicht absetzende Trübung entsteht, welche sehr störend wirkt.[1])

Aber auch in anderer Beziehung verhält sich eine Seifenlösung dem Blutserum ähnlich. Wie dieses, wird auch sie durch Zusatz von Alkalilaugen inaktiviert, wie folgender Versuch (mit physiologischer NaCl-Lösung bereitete Reagentien) zeigt:

1.	0,1 ccm Seifenlös.	+ 0,1 ccm $\frac{n}{100}$ NaOH	+ 0,9 ccm phys. NaCl.
2.	0,1 » »	+ 0,2 » »	+ 0,8 » » »
3.	0,1 » »	+ 0,3 » »	+ 0,7 » » »
4.	0,1 » »	+ 0,5 » »	+ 0,5 » » »
5.	0,1 » »	+ 1,0 » »	+ θ » »
6.	0,1 » »	+ θ »	+ 1,0 » » »

[1]) Bei der Redaktion dieser Mitteilung und Durchsicht der neuesten Literatur finde ich im Biochem. Zentralblatt 1906, S. 128, ein Referat über eine Arbeit von A. Ruffer und Crendiropoulo, demzufolge auch diese Autoren gefunden haben, dafs Erdalkalisalze, z. B. $CaCl_2$, ja sogar NaCl (!), auf hämatolytische Sera Antiwirkungen ausüben.

Nach halbstündigem Aufenthalt im Thermostaten:

1. und 6. = starke Hämatolyse, fast vollständig;
2. = schwache Andeutung von Hämatolyse;
3. = wieder stärkere Hämatolyse;
4. = wieder viel schwächer;
5. = Spuren, fast wie 2.

Auch gegen Zusatz von Säure verhalten sich Seifenlösung und Blutserum ähnlich. Bei beiden läfst sich durch Versuche eine bestimmte Säuremenge finden, durch welche sie inaktiviert oder doch in ihrer hämatolytischen Wirkung beträchtlich geschädigt werden.

Folgender Versuch mit meiner stets verwendeten Seifenlösung und mit physiologischer NaCl-Lösung bereiteter $\frac{n}{100}$ Schwefelsäure zeigt zunächst bei Zimmertemperatur die schädigende Wirkung der Säure:

1.	0,5 ccm Seifenlösung		Zu allen Proben 2 ccm 5 proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion
2.	0,5 » »	+ 0,05 ccm $\frac{n}{100}$ H_2SO_4	
3.	0,5 » »	+ 0,10 » »	
4.	0,5 » »	+ 0,15 » »	
5.	0,5 » »	+ 0,20 » »	
6.	0,5 » »	+ 0,25 » »	
7.	0,5 » »	+ 0,30 » »	
8.	0,5 » »	+ 0,50 » »	
9.	0,5 » »	+ 1,00 » »	
10.	0,5 » »	+ 2,00 » »	
11.	0,5 » »	+ 3,00 » »	

Zuerst lösen sich 11 und 10, aber unter Braunfärbung. (Wirkung der Schwefelsäure.) Hierauf Nr. 9, dann Nr. 1.

Viel später tritt Hämatolyse auf bei 2, dann bei 8, 7 und 3.

Am längsten bleiben anscheinend unverändert 5 und 6.

Die Wirkung ist verständlich, denn beim Versetzen mit Schwefelsäure werden Fettsäuren frei und diese, wiewohl auch sie Hämatolyse hervorrufen, wirken doch weniger intensiv hämatolytisch als die Seifen. In entsprechenden geringen Mengen zeigen sie nur Agglutination.

Die Wirkung von Säure auf ein Gemenge von bei 56° inaktiviertem Immunserum und Schweineserum ergibt sich aus folgendem:

1. 0,5 ccm inakt. Serum + 0,5 ccm Schweineser. + 1,1 ccm phys. Na Cl-Lösung
2. 0,5 » » » + 0,5 » » + 1,1 » $\frac{n}{100}$ Salzsäure in phys. Na Cl-Lösung, nach Zusatz von je 2 ccm 5 proz. Blutkörperchen-Emulsion in den Thermostaten gebracht.
   1. = starke Hämatolyse;
   2. = keine Hämatolyse; Flüssigkeit trübe. Nach dem Zentrifugieren stark agglutinierte Blutkörperchen.

Alle diese Versuche bestätigen also die Richtigkeit der Annahme, dafs in meinem hämatolytischen Serum die Seifen die Rolle von Komplementen spielen.

Überdies wurden aber Seifen aus Schweineserum direkt extrahiert und mein Assistent, Herr Privatdozent v. Fenyvessy, hat festgestellt, dafs sie wie andere Seifen Blutkörperchen hämatolysieren. Schweineserum wurde auf reinem Quarzsand eingetrocknet und mit siedendem Alkohol extrahiert. Der alkoholische Auszug wurde zur Trockne gebracht und mit kaltem Alkohol abermals ausgesogen. Dieser Auszug hinterläfst einen Rückstand, der sich in destilliertem Wasser oder auch in physiologischer Kochsalzlösung so wie Seife zu einer beim Schütteln schäumenden, trüben Flüssigkeit löst. Bei Zusatz einer stärkeren Säure entsteht starke Trübung, welche beim Schütteln mit Äther völlig verschwindet (Übergang der freigemachten Fettsäuren in den Äther).

Die trübe, beim Schütteln schaumbildende Flüssigkeit hämatolysiert Schweineblutkörperchen.

Wenn es also wirklich die Seifen sind, welche hier die Rolle von Komplementen spielen — oder auch andere ähnliche hämatolytisch wirkende Verbindungen, man kann z. B. an gallensaure Salze denken — diese aber, weil sie an Eiweifs gebunden sind, in den Normalseris nicht zur Wirkung gelangen können: so mufs in den Immunseris ein Körper vorhanden sein, der die Seifen frei und wirkungsfähig macht, und dieser Körper wäre eben der Immunkörper.

In den vorstehenden Mitteilungen wurden so manche Gründe angegeben, die dafür sprechen, dafs dieser Immunkörper eine Säure oder ein Gemenge von säureartigen Körpern sein dürfte.

Da wir diesen hämatolytischen Immunkörper von den mit ihm beladenen Blutkörperchen wohl abgetrennt und in Lösung gebracht haben, aber eben erst damit beschäftigt sind, ihn rein darzustellen, kann über ihn noch nichts Bestimmtes ausgesagt werden.

Aber ich habe doch Versuche gemacht, welche beweisen, dafs eine Vorstellung von dessen Wirkungsweise, wie sie soeben mitgeteilt wurde, überhaupt möglich ist, indem ich die Erscheinungen, wie sie sich bei hämatolytischen Seris zeigen, mit Gemischen willkürlich gewählter Stoffe — Seife, Ölsäure und Serumalbumin — hervorzurufen imstande war.

Die Versuche, zu denen ich nebst einer 5 proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion (aus gewaschenen Blutkörperchen so hergestellt, dafs die mit physiologischer NaCl-Lösung bereitete Emulsion die gleiche Menge Blutkörperchen enthielt, wie wenn sie aus 5 Teilen Blut und 95 Teilen physiologischer NaCl-Lösung bereitet worden wäre) eine Lösung von sapo medicinalis in physiologischer NaCl-Lösung (1 : 1000) und eine Suspension von Ölsäure verwendet habe, welche durch Schütteln einiger Tropfen dieser Säure mit physiologischer NaCl-Lösung und Filtration hergestellt war (was eine schwach opalisierende Flüssigkeit ergeben hat) haben folgendes gezeigt:

Eine konzentrierte Lösung von Serumalbumin (in physiologischer NaCl-Lösung) hebt, wie schon oben mitgeteilt wurde, die hämatolytische Wirkung einer entsprechenden Menge von Seife auf.[1]) Wird aber dem Gemenge von Seifen- und Serumalbuminlösung Ölsäure zugesetzt, aber nur in solcher Menge, welche für sich selbst noch keine Hämatolyse bewirkt, so tritt wieder Hämatolyse auf.

Die zur Aktivierung des Seifealbumingemisches eben nötige Ölsäuremenge ohne Seife (in gröfserer Menge angewandt wirkt sie schon allein hämatolytisch) bringt die Blutkörperchen nur zur Agglutination (agglutinierter Zentrifugenrückstand), ganz

---

[1]) Erst nach längerem Stehen zeigt sich wieder Hämatolyse, offenbar darum, weil sich die Eiweifsseifeverbindung mit der Zeit wieder zersetzt.

so, wie es inaktiviertes hämatolytisches Immunserum allein tut.

Wird nun ein solches durch Zusatz von Ölsäure aktiviertes Gemenge von Seifen- und Serumalbuminlösung eine halbe Stunde auf 56° erwärmt (noch viel sicherer geht man, wenn man auf 60° erwärmt und die doppelte der im nächsten Versuch angegebenen Menge von Ölsäure-Emulsion verwendet), so wird es vollständig inaktiviert, ganz so wie Immunserum. Es bleibt nur die agglutinierende Wirkung übrig.

Wird diesem bei 56° inaktiviertem Gemenge wieder etwas Seifenlösung mit oder ohne Serumalbumin zugefügt, so wird es reaktiviert.

Das Mitgeteilte ergibt sich aus folgender Versuchsreihe:

	Seifenlös.	Serumalb.-lösung	Ölsäurem.			Schweineblutk.-Emuls.
1.	1 ccm +	θ			+ 3,1 ccm phys. NaCl	+ 2 ccm
2.	1 »	+ 2 ccm +	θ		+ 1,1 » » »	+ 2 »
3.	1 »	+ 2 »	+ 0,1 ccm		+ 1,0 » » »	+ 2 »
4.	1 »	+ 2 »	+ 0,1 »	auf 56° erwärmt	+ 1,0 » » »	+ 2 »
5.	1 »	+ 2 »	+ 0,1 »	» » »	+ 1,0 » Seifenlösung	+ 2 »
6.	θ	+ 2 »	+ 0,1 »	nicht erwärmt	+ 2,0 » phys. NaCl.-L.	+ 2 »
7.		θ	+ 0,1 »		+ 4,0 » » »	+ 2 »

Die einzelnen Lösungen wurden in der oben angegebenen Reihenfolge zugesetzt.

Zunächst wurde nach dem Durchschütteln, bei Zimmertemperatur beobachtet.

Schon nach ganz kurzem Stehen war Nr. 1 komplett hämatolysiert, hierauf Nr. 5 (das reaktivierte Gemisch und Nr. 3). In den übrigen Proben noch keine Hämatolyse zu bemerken. Sie werden nun in den Thermostaten (37°) gestellt und nach $^3/_4$ Stunden herausgenommen und zentrifugiert: Nr. 2 schwache Hämatolyse; Nr. 4 keine Spur von Hämatolyse; Zentrifugenrückstand stark agglutiniert.

Nr. 6 }
Nr. 7 } wie Nr. 4.

Es mag noch ein anderer, vollständiger Versuch, bei welchem zur Reaktivierung ein Gemisch von Seifen- und Serumalbuminlösung verwendet wurde, hier Platz finden:

1.	1 ccm Seifenlös.		
2.	1 » »	+ 2 ccm Serumalb.-Lös.	
3.	1 » »	+ 2 » »	+ 0,2 ccm Ölsäure-Emuls.
4.	1 » »	+ 2 » »	+ 0,2 » »
5.	1 » »	+ 2 » »	+ 0,2 » »
6.	1 » »	+ 2 » »	
7.	1 » »	+ 2 » »	
8.		2 » »	+ 0,2 » »

Nr. 4, 5, 6, 7 wurden eine halbe Stunde auf 60^0 gehalten, die Zeit, bis die Lösungen diese Temperatur erreichen, nicht inbegriffen. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden den Gemengen 5 und 7 Gemische, bestehend aus 2 ccm Serumalbuminlösung und 1 ccm Seifenlösung zur Reaktivierung zugefügt, dann wurde mit phys. NaCl - Lösung komplettiert und zu sämtlichen Proben 2 ccm 5 proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion zugesetzt. Sie wurden in den Thermostaten gestellt (37^0). Das Ergebnis war folgendes:

Nr. 1 war schon nach 5 Minuten komplett hämatolysiert, die übrigen unverändert.

Nach $^1/_2$—$^3/_4$ Stunden zentrifugiert:
Nr. 2 schwache Hämatolyse;
» 3 und 5 fast vollständig hämatolysiert;
» 4 keine Hämatolyse;
» 6 » »
» 8 » »
» 7 stark hämatolysiert, aber noch nicht vollständig.

Nach Durchschütteln blieben sämtliche Proben 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen.

Nr. 1, 3, 5 vollständige Hämatolyse;
» 2 und 7 ungefähr gleich, enthalten noch viel ungelöste Blutkörperchen;
» 4, 6 und 8 keine Hämatolyse, zentrifugierte Flüssigkeit fast ungefärbt. Am wenigsten gefärbt Nr. 8.

(Nach so langem Stehen sieht man an der Berührungsstelle der Blutkörperschichte mit der überstehenden Flüssigkeit endlich überall rot gefärbte schmale Ringe, die aber mit dieser Reaktion nichts zu tun haben.)

Dieser Versuch hat also zweifellos ergeben:

1. dafs das Serumalbumin die Wirkung der Seife wenn auch nicht aufhebt, doch wesentlich vermindert (Nr. 1 und 2);

2. dafs die Gegenwart von Ölsäure, obwohl sie in der gleichen Menge angewendet für sich allein nach Nr. 8 keine Spur von Hämatolyse bewirkt, die schädigende Wirkung des Serumalbumins wenigstens zum grofsen Teil wieder aufhebt (Nr. 2 und 3);

3. dafs durch Erwärmen auf 60° sowohl ölsäurehaltige als ölsäurefreie Gemenge von Seife und Serumalbumin inaktiviert, aber durch nachherigen Zusatz von Seife wieder reaktiviert werden können (Nr. 4 und 6 bezw. 5 und 7), dafs aber auch hier die die Hämatolyse befördernde Wirkung der für sich allein unwirksamen Ölsäure zur Geltung kommt (5 und 7).

Gemenge, welche Seife, Ölsäure und Serumalbumin in obigen Verhältnissen enthalten, verhalten sich also dem hämatolytischen Immunserum überraschend ähnlich und es ist nicht zu verkennen, dafs hier die Ölsäure gewissermafsen die Rolle eines Immunkörpers, die Seife diejenige eines Komplementes spielt.

Der Mechanismus der betreffenden Reaktionen scheint mir nach allem Vorgebrachten nicht schwer verständlich zu sein. Er dürfte in folgendem bestehen:

Die Seife wirkt hämatolytisch, indem sich die Fettsäure mit dem Stroma, das Alkali aber mit dem Hämoglobin verbindet.

Die Wirkung der Seife wird vom Serumalbumin aufgehoben, weil es zunächst dieses ist, welches sich mit der Seife verbindet.

Die Serumalbumin-Seife-Verbindung wird von Ölsäure aktiviert, weil diese die Fähigkeit hat, jene Serumalbuminverbindung zu zersetzen und die Seife wieder freizumachen. Möglicherweise entsteht aber auch ein saures, fettsaures Alkali, welches allein oder auch in Verbindung mit Albumin die Fähigkeit hat, Blutkörperchen zu zersetzen unter Bildung einer entsprechenden Stromaverbindung (fettsaures und albuminsaures Stroma) und Hämoglobin-Alkali-Verbindung.

Bei der Inaktivierung bei 56° oder 60° scheint die Seife mit dem Albumin eine festere Verbindung einzugehen, welche von der

Ölsäure nicht mehr zersetzt wird und daher nicht mehr hämatolytisch wirkt. Es bleibt nur die Ölsäure frei, welche dann auch ihre agglutinierende Wirkung entfaltet, ähnlich wie es ja das inaktivierte Serum selbst tut.

Ich habe mich nun gefragt, ob man Schweineserum durch Zusatz von sehr geringen Mengen von Olsäure, welche die alkalische Reaktion des Serums kaum wesentlich ändern, für Schweineblutkörperchen hämatolytisch machen und es durch Hitze ebenso inaktivieren kann wie Immunserum.

Das ist nun in der Tat der Fall.

Ich habe 10 ccm Schweineblutserum 0,05 ccm frisch bereiteter Olsäure-Emulsion zugesetzt und mit dieser Flüssigkeit — A — folgenden Versuch gemacht:

1. 3 ccm Schweineser. + + 2 ccm Schweineblutk.-Em.
2. 2 » » + 1 ccm A + 2 » »
3. 2 » » + 1 » » auf 56° erhitzt + 2 » »

Nach $^3/_4$stündigem Stehen im Thermostaten:
1. keine Spur von Hämatolyse,
2. vollständige Hämatolyse,
3. keine Spur von Hämatolyse.

Es soll aber nicht verschwiegen werden, dafs eine Reaktivierung mit frischem Serum leider nicht mit Sicherheit gelungen ist; vielleicht darum, weil ich jene Inaktivierungstemperatur nicht getroffen habe, welche für dieses Gemenge gerade nötig ist.

Ich stelle mir also vor, dafs die Immunkörper Stoffe sind, welche, ähnlich wie die Ölsäure wirkend, wahrscheinlich säureartigen Charakter haben. Sie werden vom Organismus unter dem Reize der körperfremden Zellen, der Bakterien etc., abgeschieden und bringen, nach dem oben mitgeteilten Schema, die im Blutplasma stets vorhandenen Seifen — vielleicht auch andere ähnliche Verbindungen (gallensaure Salze?) — zur Wirkung. Diese Seifen wären also, wenigstens in gewissen Fällen, die Komplemente.

Die spezifische Wirkung eines Serums aber liefse sich damit erklären, dafs unter dem Reize ihrer Natur nach verschiedener körperfremder Zellen etc. ebenso ver-

schiedene Immunkörper (Säuren) abgespalten werden, vielleicht aber auch verschiedene Komplemente oder auch andere Serumbestandteile, mit denen die Immunkörper bzw. Komplemente leichter oder weniger leicht wirksame, bzw. unwirksame Verbindungen eingehen. Dieser letztere Gesichtspunkt dürfte meiner Ansicht nach bei weiteren einschlägigen Versuchen nicht mehr vernachlässigt werden, da meine Versuche ja erwiesen haben, wie sehr die Aktivität meines hämatolytischen Serums von der Reaktion (der Hydroxyl-Ionen-Konzentration) desselben, ferner auch von anderen Bestandteilen (Kalk- und Magnesiumsalzen) abhängt.

Ich halte es daher für ganz gut möglich, dafs viele negative Befunde bei Versuchen, welche zur Entscheidung der Frage vorgenommen wurden, ob nach Einverleibung eines bestimmten Mikroorganismus Immunserum gewonnen werden kann oder nicht, nur scheinbar solche negative Befunde sind und dafs man bei genauerem Zusehen vielleicht finden wird, dafs die gesuchten Schutzstoffe vorhanden waren, ihre Wirkung aber durch Nebenumstände, wie die oben angedeuteten, verdeckt wurde.

Von welchen scheinbar geringfügigen Dingen, in Wirklichkeit aber bedeutsamen chemischen Reaktionen und Gleichgewichtszuständen die Wirkung eines Serums abhängen kann, dafür mag folgender Versuch sprechen, der zugleich das Zusammenwirken meines künstlichen hämatolytischen Immunkörpers, der Ölsäure, mit Normalserum in eklatanter Weise demonstriert.

Um eine möglichst gut verteilte Emulsion von Ölsäure zu erhalten, habe ich 20 ccm physiologische NaCl-Lösung mit 0,5 ccm Olsäure und 1 ccm normalem Schweineblutserum tüchtig geschüttelt. Diese Emulsion wollen wir **O** nennen.

Gibt man 0,2 ccm **O** zu 2 ccm 5 proz. Schweineblutkörperchen-Emulsion und dann hiezu (zur Komplettierung) noch 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung, so bleibt das Gemisch ziemlich lange anscheinend unverändert trübe; Hämatolyse tritt nur langsam ein, und es dauert ziemlich lange, bis sie vollständig wird.

Fügt man aber dem Gemische von 0,2 ccm **O** und 2 ccm Schweineblutkörperchen - Emulsion 2 ccm Schweineblutserum zu, so tritt fast momentan vollständige Hämatolyse ein.

(Schweineblutserum ist natürlich ohne O vollständig unwirksam.) Dieser Versuch zeigt also, dafs eine rasche und ausgiebige Hämatolyse nur dann eintritt, wenn die beiden Stoffe — die als Immunkörper fungierende Ölsäure und das Normalserum — zusammenwirken. Ölsäure-Emulsion allein wirkt viel langsamer, Serum gar nicht.

Wird aber der Versuch nun in der Weise umgekehrt, dafs man 0,2 ccm O nicht direkt zu den Blutkörperchen gibt, sondern mit 2 ccm Serum mischt, und fügt man nun dieses Gemisch zu der Blutkörperchen-Emulsion, so tritt bei Zimmertemperatur, bei welcher diese Versuche vorgenommen werden, auch nach mehrstündigem Stehen keine Hämatolyse ein.

Die Ölsäure hat offenbar ihren nächsten Angriffspunkt, welcher im ersten Versuch das Blutkörperchen selbst war, gewechselt. Man kann annehmen, dafs die Blutkörperchen im ersteren Falle durch die Ölsäure für den Angriff des Blutserums vorbereitet, präpariert waren, denn es gelang mir, die Ölsäure von den Blutkörperchen wieder zu trennen und sie als solche zu identifizieren.

Zum Schlusse sei mir noch folgende kurze Bemerkung gestattet.

Es drängt sich natürlich die Frage auf, wie sich meine Erfahrungen zur Seitenkettentheorie Ehrlichs verhalten?

Meiner Ansicht nach lassen sie sich, soweit die Sache bis jetzt zu überblicken ist, mit jener Theorie recht gut vereinen. Zunächst präjudiziert sie ja der Natur des Immunkörpers in keiner Weise. Die Seitenketten können ebenso Säuren wie etwas anderes sein.

Ob der Immunkörper nach Ehrlichs Vorstellung ein Amboceptor (oder Polyceptor) ist, und ob die Ölsäure in meinem Versuche derartig aufgefafst werden soll, ist allerdings nicht sichergestellt, allein ich sehe nichts, was entschieden dagegen spräche. Sie ist, wie ich direkt nachweisen konnte, jedenfalls imstande, sich auch mit den Blutkörperchen zu verbinden, ja es beschleunigt die Hämatolyse, wenn das vorher — vor dem Zusatz normalen

Serums — geschehen ist. Dafs dies auch im Sinne Bordets und Grubers als Sensibilisierung oder Präparierung aufgefafst werden kann, spielt einstweilen keine Rolle.

Was schliefslich das Komplement betrifft, so kann man sich recht gut vorstellen, dafs das, was Ehrlich so nennt, eigentlich nichts anderes ist als eine Verbindung von Seife mit einem Eiweifskörper und dafs dessen »toxophore Gruppe« die Seife selbst ist, welche durch die Reaktion des Immunkörpers (z. B. der Olsäure in meinem Versuche) freigemacht wird und so zur Wirkung gelangt.

Die Bedeutung der durch Hetol (zimtsaures Natron) hervorgerufenen Hyperleukozytose bei der intravenösen und subkutanen Milzbrandinfektion des Kaninchens.

Von

Gottfried Boehm.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität München. Vorstand: Prof. M. Gruber.)

Durch die Beobachtungen von Gruber und Futaki[1]) wurde die Aufmerksamkeit wieder auf die Phagozyten als kräftige Vernichter der Milzbrandbazillen hingelenkt. Es war auf Grund dieser Beobachtungen die Vermutung gerechtfertigt, daſs der groſse Unterschied der Gefährlichkeit intravenöser und subkutaner Einverleibung von Milzbrandbazillen, der von Noetzel[2]) beobachtet worden ist, seine Erklärung finden könnte, und ich unternahm auf Veranlassung von Herrn Obermedizinalrat Prof. Dr. Max Gruber Versuche über den Einfluſs der Hyperleukozytose auf den Erfolg der Infektion des Kaninchens mit genau abgestuften Dosen von virulenten Milzbrandbazillen.

Derartige Versuche sind schon von verschiedenen Autoren angestellt worden. Nachdem durch die Untersuchungen von Metschnikoff festgestellt war, daſs die Leukozyten bei der Bekämpfung bakterieller Invasionen in den tierischen Organis-

1) Zentralbl. f. Bakt., Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten, Bd. 38, 1906. Beiheft.

2) Archiv f. klinische Chirurgie, 1900.

mus eine grofse Rolle spielen, wurde bald versucht, durch künstliche Vermehrung der Leukozyten im Blute die Widerstandskraft von Versuchstieren gegen Infektionen zu steigern.

Noch bevor die Wirkung der Hyperleukozytose auf bakterielle Infektionen allgemein bekannt war, fanden Wooldridge[1]), Wright[2]), Zacharoff[3]), Brieger, Kitasato und Wassermann[4]) und Grammatschikoff[5]), dafs nach Injektion von Thymus-, Hoden-, Lymphdrüsen- und Spermaextrakten die Widerstandskraft der Versuchstiere gegen Milzbrand gesteigert wurde, und man glaubte, dafs diesen Stoffen spezifisch immunisierende Kräfte eigen seien. Erst aus späteren Versuchen ging hervor, dafs die Erklärung der günstigen Wirkung in der von diesen Stoffen hervorgerufenen Hyperleukozytose zu suchen ist.

Die Mehrzahl der Autoren bedienten sich dann nicht des Milzbrandbazillus, um den Einflufs der Hyperleukozytose zu studieren, sondern anderer Krankheitserreger. So schützte Victor Vaughan[6]) Kaninchen durch Injektion von Nukleïnsäure vor den schädlichen Folgen einer Infektion mit dem Diplococcus pneumoniae, und Loevy und Richter[7]) teilten in einem kurzen Bericht ebenfalls günstige Resultate der Hyperleukozytose bei der Pneumokokkeninfektion mit.

Dann folgte die sehr eingehende Arbeit von Jacob.[8]) Dieser injizierte seinen Versuchskaninchen Lösungen von Albumosen, und da durch diese nicht nur eine Vermehrung der Leukozyten, sondern, dieser vorausgehend, auch eine starke Hypoleukozytose verursacht wird, konnte er sowohl den Einflufs der Hypo- als auch den der Hyperleukozytose auf die

1) Wooldridge, Archiv für Anatomie und Physiologie, physiol. Abt. Bd. III, 1883.

2) Wright, Brit. med. Journ., 1891.

3) Zacharoff, Zentralblatt für Bakteriologie, 17.

4) Brieger, Kitasato u. Wassermann, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 12.

5) Grammatschikoff, Annales de l'institut Pasteur, 1893.

6) Kongrefs in Budapest (Ref. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 16).

7) Deutsche med. Wochenschr., 1895.

8) Zeitschr. f. klin. Medizin, 1896.

Pneumokokkeninfektion studieren. Er fand, »dafs wenn ein Tier im Stadium der durch subkutane oder intravenöse Injektion bedingten Hypoleukozytose infiziert wurde, dasselbe stets zugrunde ging, und zwar meist schneller als das betreffende Kontrolltier. Dagegen war es von äufserst günstigem Einflufs auf den Krankheitsverlauf, wenn die Infektion zur Zeit der Hyperleukozytose geschah, und zwar im aufsteigenden Ast derselben.«

Blumreich und Jacobi[1]) steigerten die Leukozytenzahl bei Kaninchen durch Milzexstirpation und fanden, dafs bei Pyocyaneus- und Cholera-Infektion die Widerstandskraft der entmilzten Tiere gegen die der normalen bedeutend gestiegen war.

Im Jahre 1898 veröffentlichten Loevy und Richter[2]) ihre schon 1895 kurz mitgeteilten und bis dahin weiter ausgeführten Versuche über den Einflufs der Hyperleukozytose auf Hühnercholerabazillen und Pneumoniediplokokken. Als leukozytoseerregende Mittel kamen, — abgesehen von dem wegen seiner Nebenwirkungen bald verlassenen Pilokarpin — Spermin und Nukleïn zur Verwendung. Die Erfolge bei den Hühnercholerainfektionen waren geringe. Am günstigsten gestalteten sich die Versuche mit den Pneumokokken.

Über den Einflufs der Hyperleukozytose auf die Milzbrandinfektion finden wir nur Angaben von Pawlowsky[3]), M. Hahn[4]) und Blumreich und Jacobi.[5]) Pawlowsky sah nach Injektion leukozytoseerregender Proteïne günstige Wirkung auf die Milzbrandinfektion. Hahn benutzte zur Vermehrung der Leukozyten »ein Albumosengemenge, das aus feuchtem Fibrin durch Verdauung mit 2proz. Papajotinlösung hergestellt war....« Der Erfolg der Hyperleukozytose bestand meist in einer Verzögerung des Verlaufs der Milzbrandinfektion, aber

1) Berliner klin. Wochenschr., 1897, S. 444.
2) Virchows Archiv, Bd. 151, S. 220.
3) Mitteilungen des XI. internationalen Kongresses.
4) Archiv f. Hygiene, Bd. 28, 1897.
5) a. a. O.

nur in zwei Fällen trat vollkommene Heilung ein. Hahn schiebt die Schuld der geringen Wirkung hauptsächlich auf den Umstand, daſs die Hyperleukozytose beim Kaninchen nach einmaliger Injektion des die Leukozyten anlockenden Mittels von sehr kurzer Dauer zu sein pflegt. Blumreich und Jacobi endlich fanden im Gegensatz zu ihren Erfolgen gegen Pyocyaneus- und Cholerainfektion nach Exstirpation der Milz bei Milzbrandinfektion keinen Unterschied gegen die Normaltiere.

Durch die bisher veröffentlichten Versuche ist also der schädigende Einfluſs der Hyperleukozytose auf eine ganze Reihe pathogener Mikroorganismen unzweifelhaft festgestellt. Nur beim Milzbrand waren die Erfolge schwankend, und da dieser Bazillus, wie u. a. auch neuerdings aus Versuchen von R. Schneider, Gruber und Futaki hervorgeht, bezüglich seines Verhaltens im tierischen Organismus gewissermaſsen eine Sonderstellung einnimmt, war es von besonderem Interesse, die vorhandenen Erfahrungen durch neue Versuche zu erweitern.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde zur Erzeugung der Hyperleukozytose stets das Hetol (zimtsaures Natron) Landerer verwendet. Landerer[1]) selbst stellte seit dem Jahre 1882 zahlreiche Versuche über die Wirkung der Zimtsäure und ihrer Salze am tierischen und menschlichen Organismus an und kennzeichnet sie als ungiftige, weder Blut noch Nieren schädigende Stoffe. — Im selben Sinne äuſserten sich u. a. Richter[2]) und Spiro[3]), die auch speziell die Wirkung der Zimtsäure auf das Blut untersuchten. Ihre hierauf bezüglichen Ergebnisse seien in Kürze hier zusammengefaſst.

Sie benutzten zur intravenösen Injektion beim Kalt- und Warmblüter 1—5 proz. Lösungen von zimtsaurem Natrium und

1) Münchener med. Wochenschr., 1888, 1889.
Deutsche med. Wochenschr., 1890 und 1893.
»Die Behandlung der Tuberkulose mit Zimtsäure«, 1892.
Vortrag auf dem Tub.-Kongreſs Berlin 1899.
Berliner Klinik 1901.
2) Virchows Archiv, Bd. 133.
3) Inaug.-Dissert., 1893.
2) u. 3) Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol., 1894.

fanden, was zunächst die Zahlenveränderungen der Leukozyten anlangt, im Durchschnitt 3—4 Stunden nach einmaliger Injektion eine etwa 3—4 fache Vermehrung, die bis über 90% auf Rechnung der polynukleären Formen zu setzen war. Zum Vergleich mit meinen, weiter unten angeführten Resultaten sei hier kurz eine ihrer Tabellen wiedergegeben:

Versuch mit einer Lösung von zimtsaurem Natrium (injiziert 0,5 g in die Ohrvene eines Kaninchens):

Vor der Injektion	9 406	Leukozyten
2 Stunden nach der Injektion	13 736	»
4 » » » »	34 204	»
20 » » » »	16 122	»
24 » » » »	8 100	»

Bezüglich der Arten der Leukozyten stellten Richter und Spiro fest, daſs, wie schon oben erwähnt, die polynukleären Zellen in der Überzahl waren; sie fanden im Durchschnitt ein Anwachsen der polymorphkernigen Formen um 20—30%.

Um mich durch eigene Anschauung von der Wirkungsweise des Hetols zu überzeugen, prüfte ich die bezüglich der farblosen Blutzellen oben zitierten Ergebnisse nach und konnte sie im groſsen und ganzen bestätigen. Es sei mir gestattet, mein Vorgehen, da es bei allen Versuchen das gleiche war, etwas eingehender zu schildern.

Es kam stets eine 5 proz., d. h. nahezu gesättigte Hetollösung in physiologischer Kochsalzlösung zur Verwendung. Diese wurde vor der Injektion stets filtriert und 7—10 Minuten im kochenden Wasserbad sterilisiert. Dann wurden regelmäſsig 10 ccm dieser Lösung (also 0,5 g Hetol in Substanz) nach Rasur und Sterilisierung der betreffenden Ohrpartie in die groſse Sammelvene des Ohrs injiziert. Geringere Mengen und weniger konzentrierte Lösungen hatten keine so prompte und hohe Hyperleukozytose zur Folge. Es wurde daher von Anfang an von der Verringerung des Injektionsquantums Abstand genommen. Ich sah auch, mit Ausnahme von 2—3 Fällen, in denen die Tiere eine schnell vorübergehende Schwäche zeigten, niemals einen ungünstigen Einfluſs der Hetolinjektion.

Schon 2—4 Stunden nach der Injektion erreichte die Zahl der Leukozyten in der Regel den 2—4fachen Wert der Norm, und schon im Laufe der 4. bis 5. Stunde war der Höhepunkt überschritten. Zur Illustration seien einige Versuche wiedergegeben.

Protokolle:

Kaninchen Nr. 19. — 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die Ohrvene injiziert, vorher Zählung der Leukozyten:

Vor der Injektion	8 800	Leukozyten
5 Stunden nach der Injektion . . .	29 000	»
7 » » » » . . .	13 000	»

Kaninchen Nr. 23. — 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die Ohrvene injiziert, vorher Zählung der Leukozyten:

Vor der Injektion	6 400	Leukozyten
2 1/2 Stunden nach der Injektion . .	21 400	»
3 1/2 » » » » . .	21 200	»
4 1/2 » » » » . .	16 000	»

Kaninchen Nr. 24. — 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die Ohrvene injiziert, vorher Zählung der Leukozyten:

Vor der Injektion	8 200	Leukozyten
2 1/2 Stunden nach der Injektion . .	23 000	»
3 1/2 » » » » . .	20 800	»
4 1/2 » » » » . .	15 000	»

Es ist also bei meinen Versuchen der Ablauf der Hyperleukozytose ein etwas schnellerer gewesen als bei denen von Richter und Spiro; solche geringe Unterschiede erklären sich aber wohl ohne weiteres durch die Schwankungen in der Reaktionsweise verschiedener Kaninchenarten.

Da ich bei der Durchsicht der Literatur eine Angabe von F. Charteris und E. Provau-Cathart[1]) fand, welche, entgegen den Aufstellungen von Landerer, Richter und Spiro[2]) behaupten, daſs nach der intravenösen Hetolinjektion beim Kaninchen die Vermehrung der Leukozyten beinahe völlig durch die mononukleären Formen bewirkt sei, kontrollierte ich auch das Blutbild vor und nach der Injektion. Die Blutpräparate wurden zu diesem Zweck nach der Mayschen Methode herge-

1) Journ. f. Pathol. u. Bakteriol. 10, zitiert nach Malys Jahresber. 1904/05.
2) a. a. O.

stellt und gefärbt, und es ergaben sich folgende Verhältniszahlen:

A. Zahl der Leukozyten vor dem Versuch		8 800
davon:	grofse einkernige Leukozyten	14 %
	Lymphozyten	69 %
	polynukleäre Leukozyten	17 %.

Als absolute Zahlen wurden aus den Prozentzahlen berechnet:

grofse einkernige Leukozyten	1 232
Lymphozyten	6 072
polynukleäre Leukozyten	1 496.

B. Zahl der Leukozyten 4 1/2 Stunden nach der Hetolinjektion		22 000
davon:	grofse einkernige Leukozyten	4 %
	Lymphozyten	46 %
	polynukleäre Leukozyten	50 %.

Als absolute Zahlen wurden aus den Prozentzahlen berechnet:

grofse einkernige Leukozyten	880
Lymphozyten	10 120
polynukleäre Leukozyten	11 000.

Wenn ich auch so hohe Prozentsätze der polymorphkernigen Zellen, wie sie Richter und Spiro fanden (— etwa 50% im normalen und bis zu 90% im vorbehandelten Blut) nicht konstatieren konnte, so geht doch ebenfalls aus dem angeführten Beispiel hervor, dafs die polynukleären Formen die Hauptrolle bei der durch Hetol hervorgerufenen Hyperleukozytose spielen. Wenn auch die Zahl der Lymphozyten eine geringere Zunahme erfährt, so kann doch von einer überwiegenden Vermehrung dieser Zellen nicht die Rede sein.

Bevor ich daran gehen konnte, den Einflufs der Hetolvorbehandlung auf die Milzbrandinfektion zu studieren, mufste ich zunächst für den mir zur Verfügung stehenden Milzbrandstamm die Maximaldosen, ausgedrückt durch die mit Hilfe des Plattenverfahrens kontrollierten Zahlen der eingeführten Milzbrandkeime, feststellen. Über die Grenzwerte der von Kaninchen vertragenen Milzbrandkeimzahlen lagen, wie ich bereits eingangs erwähnt habe, ausführliche Versuche von W. Noetzel[1]) vor, und es

1) a. a. O.

handelte sich im wesentlichen um Nachprüfung seiner Resultate im Sinne der Feststellung eines eventuellen Unterschiedes seines und meines Milzbrandstammes.

In seinen Untersuchungen über die Wege der Bakterienresorption von frischen Wunden konstatierte Noetzel, dafs 2000 Keime eines Milzbrandstammes intravenös und intraperitoneal gut vertragen wurden, während 50 Keime desselben Stammes, subkutan appliziert, sicher tödlich wirkten. Bei der intravenösen Infektion bediente er sich der Vena jugularis. Diese wurde ausgiebig freigelegt und das Operationsfeld durch sterile Gaze vor etwa daneben geratener Bakterienaufschwemmung geschützt. Nach doppelter Unterbindung wurde dann das durch die Injektion verletzte Venenstück reseziert. Er selbst erwähnt in seiner Arbeit Bunges Verfahren, der die Ohrvene zur Infektion benutzte und das betreffende Ohr nach drei Minuten mit dem Paquelin amputierte, um zu verhindern, dafs an der Einstichstelle sich festsetzende und zur Vermehrung kommende Milzbrandkeime von da sekundär in die Blutbahn gelangten, und so eine genaue intravenöse Dosierung unmöglich machten.

Bei der Feststellung der Virulenz unseres Stammes bediente ich mich, wie Bunge, der Ohrvene, da Noetzels Verfahren viel schwieriger ohne Infektion der Wunde auszuführen ist, und da ich fürchtete, dafs die grofse Wunde am Hals einen locus minoris resistentiae gegenüber einer sekundären Milzbrandinfektion vom Blute aus bilden könnte.

Die die Einstichstelle enthaltende Ohrpartie schaltete ich teils durch Abklemmen, teils genau nach Bunges Vorgehen, durch Abtragen mit dem Paquelin aus dem Kreislauf aus. Die Klemme blieb liegen, bis das distale Ende durch trockene Gangrän abgestofsen war, was innerhalb weniger Tage geschah.

Die subkutane Infektion erfolgte stets in das Unterhautzellgewebe am Bauche, nachdem die betreffende Hautstelle rasiert und nach Möglichkeit sterilisiert war.

Zur Infektion dienten 7—8 Stunden bei 37° gezüchtete Agarstrichkulturen, also ein aller Wahrscheinlichkeit nach völlig sporenfreies Material. Nach feiner, etwa 2—3 Minuten langer

Zerteilung und Zerreibung einer kleinen, mit dem Plattenmikroskop als rein erkannten Partie der Kultur auf dem Nährboden wurde die geeichte Öse gefüllt, auf beiden Seiten glatt verstrichen und dann in 0,85 proz. steriler Kochsalzlösung, der auf 100 ccm 1,0 ccm steriler Bouillon beigemengt war, aufgeschwemmt. Auf diese Weise konnte die beabsichtigte Keimzahl fast immer durch die entsprechenden Verdünnungen erreicht werden. Bei allen Infektionen wurde die Dosis durch das Plattenverfahren kontrolliert. Nach der Infektion des Tieres wurden stets behufs Feststellung der Zahl der injizierten Keime ent weder mit derselben Pravazspritze, die zur Injektion bentuzt worden war oder mittels geeichter Kapillarpipetten genau gemessene Mengen derselben Bakterienaufschwemmung zu Gelatine- oder Agarplatten verarbeitet.

Die folgenden Tabellen enthalten die Resultate meiner sämtlichen Versuche am normalen Tier. Aufserdem sei es mir gestattet, die Ergebrisse von Versuchen beizufügen, die Herr Dr. K. Futaki mit demselben Milzbrandstamm erhalten und mir in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt hat. Es sei dazu noch erwähnt, dafs Futaki zur intravenösen Infektion in der Mehrzahl der Fälle die vena jugularis benutzte. Nur in zwei Fällen bediente er sich der Ohrvene. Die subkutanen Impfungen wurden wie die meinigen ausgeführt.

A. Subkutane Infektion.

Nr. des Versuchstiers	Gewicht g	Keimzahl	Lebensdauer	Todesursache	Ödem	Bemerkungen
7	3000	20	überlebt	—	—	—
29	2200	25	16 Tage	nicht Milzbrand	—	—
30	2500	50	überlebt	—	—	—
31	2300	75	5 Tage	Milzbrand	+	—
50	1470	200	überlebt	—	—	wahrscheinlich refraktär
56	1600	200	3 Tage	Milzbrand	+	—
59	2170	900	überlebt	—	—	wahrscheinlich refraktär
62	2800	5000	2 Tage	Milzbrand	+	—
67	2520	5000	3 Tage	Milzbrand	+	—

A₁. Subkutane Infektion nach Futaki.

Nr. des Versuchstiers	Gewicht g	Keimzahl	Lebensdauer	Todesursache
477	2200	75	7 Tage	nicht Milzbrand
478	2100	75	überlebt	—
479	2300	75	7 Tage	nicht Milzbrand
474	2000	90	überlebt	—
475	2100	90	14 Tage	nicht Milzbrand
476	2200	90	18 »	» »
465	2950	100	5 »	Milzbrand
466	2950	100	7 »	»
467	2350	100	9 »	»
468	1720	100	8 »	»
469	2200	100	8 »	»
470	1900	100	8 »	»
471	3020	100	7 »	»
472	3020	100	8 »	»
473	3170	100	5 »	»

B. Intravenöse Infektion.

Nr. des Versuchstiers	Gewicht g	Keimzahl	Lebensdauer	Todesursache	Ödem am Ohr
11	1950	1000	überlebt	—	—
13	1800	1500	4 Tage	Milzbrand	—
15	2000	2000	überlebt	—	—
14	1700	2500	3 Tage	Milzbrand	—
9	2000	3000	3 »	»	—
34	2300	3000	3 »	»	—
33	2330	4500	3 »	»	—
32	2350	6000	3 »	»	—

B₁. Intravenöse Infektion nach Futaki.

Nr. des Versuchstiers	Gewicht g	Keimzahl	Lebensdauer	Todesursache	Infektionsstelle
607	2200	60	überlebt	—	V. jugularis
615	2070	140	»	—	»
538	1750	640	»	—	Ohrvene
535	1750	1070	»	—	»
543	?	1210	»	—	V. jugularis
546	2200	1430	14 Tage	nicht Milzbrand	»

Es ergibt sich aus diesen Tabellen, dafs man Kaninchen von 2—3 kg Körpergewicht, mit einer Ausnahme — Tod auf 1500 Keime — bis zu 2000 Keime in die Blutbahn bringen konnte, ohne dafs irgendeine nachteilige Wirkung für das Tier zu konstatieren gewesen wäre. Bei subkutaner Impfung wurden 50 Keime mit Sicherheit vertragen, während Infektionen mit über 100 Keimen stets tödlich verliefen. Zu diesen Zahlen mufs bemerkt werden, dafs unser Milzbrandstamm in langen Fäden wächst, so dafs ein einziger Faden eine sehr grofse Zahl von Zellen enthält. Die tödlichen Dosen des von mir verwendeten Milzbrandstammes decken sich also fast genau mit den von Noetzel gefundenen Zahlen.

Da der Höhepunkt der Hetol-Hyperleukozytose schon nach 3—4 Stunden erreicht wird, es aber, wie auch Jacob beobachtete (s. oben), für eine ausgiebige Wirksamkeit der Hyperleukozytose von Wichtigkeit ist, dafs die Infektion in den aufsteigenden Ast derselben fällt, applizierte ich die Keime stets 2—2½ Stunden nach der Hetolinjektion. Dem relativ schnellen Absinken der Hyperleukozytose durch eine erneute Hetolgabe vorzubeugen, war aus folgendem Grunde nicht angezeigt. In kurzen Intervallen aufeinanderfolgende Injektionen von 10 ccm in die Blutbahn wären schwerlich ohne Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens geblieben, hätten also die beabsichtigte günstige Wirkung womöglich kompensiert. Aufserdem waren in vielen Fällen beide Ohren, das eine für die Hetol-, das andere für die Milzbrandinjektion verbraucht, und somit keine Möglichkeit mehr gegeben, die Stichwunden späterer Hetolinjektionen aus dem Kreislauf zu eliminieren. Jede frische Wunde hätte aber für durch den Kreislauf verschleppte Keime einen Nährboden geschaffen, und durch die Vermehrung der Milzbrandbazillen an einer solchen Stelle wäre die genaue Dosierung illusorisch gemacht worden.

I. Einflufs der Hetolvorbehandlung auf intravenöse Milzbrandinfektion.

Es wurden im ganzen 14 intravenöse Infektionen nach Vorbehandlung mit 5proz. Hetollösung ausgeführt, von denen fünf wegen zu hoher Dosis (über 6000 Keime) nicht mitangeführt werden sollen. Sie endeten alle fünf tödlich.

Die übrigbleibenden neun verliefen wie folgt:

Protokolle:

A. Tödlich verlaufene Infektionen.

(Die Versuche sind nach der Höhe der Dosis geordnet.)

1. Kaninchen 41. — Gewicht 1900 g.

19. X. 1/24 Uhr: Infektion von 10 ccm einer 5proz. Hetollösung in die eine Ohrvene.

1/26 Uhr: Infektion mit 2100 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohres. Injektionsstellen abgeklemmt.

20. X. Gewicht 1950 g. Keine Ödeme.

22. X. Gewicht 1800 g exitus.

Sektion: Milz vergröfsert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

2. Kaninchen 26. — Gewicht 2170 g.

10. IX. 3 15 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

5 25 Uhr: Infektion mit 4500 Milzbrandkeimen in dieselbe Vene. Injektionsstellen abgeklemmt.

11. IX.: Gewicht 2020 g. Keine Ödeme.

12. IX.: Gewicht 1940 g. Geringes Ödem proximal der Klemme.

13. IX.: Gewicht 1700 g. Ödem stärker.

14. IX.: Exitus.

Sektion: Milz vergröfsert, am Ohr deutliches Ödem.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

3. Kaninchen 44. — Gewicht 1450 g.

25. X. 3 30 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5proz. Hetollösung in die eine Ohrvene.

6 Uhr: Infektion mit 4500 Milzbrandkeimen in die andere Ohrvene. Beide Ohren wurden in der Nähe der Wurzel mit dem Paquelin abgetragen.

26. X.: Gewicht 1450 g. Keine Ödeme.

27. X.: Exitus.

Sektion: Beiderseits lobulärpneumonische Herde, Milz vergröfsert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

4. Kaninchen 39. — Gewicht 2750 g.

19. X. 3 30 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

5 30 Uhr: Infektion mit 4900 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohres. Injektionsstellen beiderseits abgeklemmt.

20. X.: Gewicht 2700 g. Keine Ödeme.

22. X.: Gewicht 2550 g. An beiden Ohren geringe Schwellung.

23. X.: Gewicht 2550 g. Exitus.

Sektion: Die Ohren proximal der Klemmen, beide deutlich ödematös, Milz vergrößert, Pneumonie beiderseits.

Ausstriche: (Herzblut, Lungen- und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

5. Kaninchen 27. — Gewicht 1700 g.

10. IX 3 25 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

5 35 Uhr: Infektion mit 6000 Milzbrandkeimen in dieselbe Ohrvene, Injektionsstellen abgeklemmt.

11. IX.: Gewicht 1720 g. Keine Ödeme.

12. IX.: Gewicht 1700 g. Keine Ödeme.

13. IX.: Gewicht 1670 g. Keine Ödeme.

14. IX.: Exitus.

Sektion: Milz vergrößert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

6. Kaninchen 43. Gewicht 1800 g.

25. X. 3 15 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die eine Ohrvene.

6 Uhr: Infektion mit 6000 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohrs. Beide Ohren an der Wurzel mit dem Paquelin abgetragen.

26. X.: Gewicht 1880 g. Keine Ödeme.

27. X.: Gewicht 1870 g. Keine Ödeme.

29. X.: Gewicht 1880 g. Exitus.

Sektion: Milz vergrößert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

B. Überstandene Milzbrandinfektionen.

7. Kaninchen 21. — Gewicht 2570 g.

3. VIII. 11 Uhr Vorm.: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

5 Uhr Nachm.: Infektion mit 3000 Milzbrandkeimen. Die Injektionsstellen wurden abgeklemmt.

Das Tier lebt ohne Gewichtsabnahme und Krankheitserscheinungen bis zum 15. VIII. An diesem Tage exitus.

Sektion: o. B.
Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) steril.
Todesursache nicht Milzbrand.

8. Kaninchen 40. — Gewicht 2100 g.
19. X. 3 30 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene,
5 30 Uhr: Infektion mit 3500 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohrs. Beide Ohren abgeklemmt.
20. X.: Gewicht 2150 g. Kein Ödem.
22. X.: Gewicht 2100 g. Geringes Ödem des Ohres, an dem die Hetolinjektion vorgenommen wurde.
23. X.: Gewicht 2150 g. Ödem besteht noch.
24. X.: Gewicht 2126 g. Ödem fast ganz zurückgegangen.
25. X.: Gewicht 2170 g. Ödem verschwunden.
29. X.: Gewicht 1850 g. Kein Ödem.
3. XI.: Gewicht 2150 g. Kein Ödem.
9. XI.: Gewicht 2050 g. Kein Ödem.
19. XI.: Gewicht 1820 g. Kein Ödem. Exitus.
Sektion: Rechte Lunge pneumonisch, rechte Pleura und das Perikard zeigen dicke fibrinöse Auflagerungen, linke Lunge auch leicht pneumonisch, linke Pleura frei.
Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) steril, Lunge: kurzes Stäbchen.
Todesursache nicht Milzbrand.

9. Kaninchen 25. — Gewicht 2000 g.
10. IX. 3 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
5 25 Uhr: Infektion mit 5250 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohres. Beide Ohren abgeklemmt.
11. IX.: Gewicht 2020 g. Keine Ödeme.
12. IX.: Gewicht 1980 g. Keine Ödeme.
15. IX.: Gewicht 1850 g. Keine Ödeme.
18. IX.: Gewicht 1650 g. Keine Ödeme.
25. IX.: Gewicht 1650 g. Keine Ödeme.
29. IX.: Gewicht hat nicht mehr abgenommen, die distalen Enden beider Ohren sind abgefallen. Das Tier zeigt keine Krankheitserscheinungen. Die Infektion kann als überstanden betrachtet werden.

Zur besseren Übersichtlichkeit sei diese Versuchsreihe in einer Tabelle (S. 357) kurz zusammengefaſst.

Die Entstehung der Ödeme in den Fällen 2, 4 und 8 kann man sich auf zweierlei Weise erklären. Entweder sind durch den Zug der am Ohr hängenden Klemme kleinere innere Gewebszerreiſsungen verursacht worden, die den Nährboden für eine

sekundäre Ansiedlung und Vermehrung von Milzbrandbazillen abgegeben haben. In diesem Falle wäre also die Schwellung als Milzbrand-Ödem aufzufassen. Eine primäre, lokale Infektion, die durch die Injektion der Bakterienaufschwemmung verursacht worden wäre, ist ohne weiteres auszuschliefsen, da sich der Einstich stets in der Nähe der Ohrspitze befand, und die Klemme, weit davon entfernt, in der Nähe der Ohrwurzel angelegt wurde.

Tabelle I.

Nr. des Versuchs	Zahl der eingebrachten Keime	Ödeme	Gewichtsveränderung in g	Tod an Milzbrand nach	Bemerkungen
1.	2100	—	— 100	3 Tagen	—
7.	3000	—	—	—	—
8.	3500	vorübergehend am Hetolohr	— 280	—	—
2.	4500	am Ohr, das beiden Injektionen diente	— 470	4 Tagen	—
3.	4500	—	—	2 »	—
4.	4900	an beiden Ohren	— 200	4 »	—
9.	5250	—	— 350	—	wahrscheinlich refraktär
5.	6000	—	— 30	4 Tagen	—
6.	6000	—	+ 80	4 »	—

Die andere Erklärung könnte man nach den Beobachtungen Spiros[1]) darin suchen, dafs bei der Injektion der grofsen Menge Hetollösung ein Teil davon in das subkutane Gewebe ausgetreten sei und sich dort eine von dem chemotaktisch wirkenden Hetol leicht verursachte seröse Entzündung ohne Mitwirkung von Mikroorganismen gebildet habe. In allen Fällen von Ohrödem konnten Milzbrandbazillen in der Ödemflüssigkeit mit dem Mikroskop nachgewiesen werden. Dieser positive Befund an sich kann aber noch nicht genügen, um die Ödeme alle als Milzbrandödeme zu kennzeichnen, denn Milzbrandkeime werden während der Agone über das ganze Gefäfssystem verstreut und die im Mikroskop gefundenen könnten aus Kapillaren stammen, die bei dem zur Entnahme der Ödemflüssigkeit unumgänglichen Ein-

1) Inaugural-Dissertation 1893, S. 22.

schnitt angeschnitten worden sind. Die Untersuchung der Ödemflüssigkeit während des Lebens verbot sich wegen der unvermeidlichen Wunde von selbst. Im Fall 4 spricht das Auftreten des Ödems an beiden Ohren für die erste Art der Erklärung, während im Fall 8 die Entstehung des Ödems allein an dem Ohr, das der Hetolinjektion diente, und der harmlose Verlauf die zweite Erklärung näherliegend erscheinen läfst.

Den günstigen Verlauf in den Fällen 7, 8 und 9 könnte man durch eine Erhöhung der Widerstandskraft infolge der Hetolvorbehandlung erklären, denn in allen drei Fällen übersteigt die verabreichte Keimzahl, wenn auch nicht sehr erheblich, die vom normalen Kaninchen vertragenen Dosen. Bei der geringen Differenz wäre es jedoch unmöglich, aus diesen Ergebnissen einen sicheren Schlufs zu ziehen.

II. Verlauf der subkutanen Milzbrandinfektion nach Vorbehandlung mit Hetol.

Bei den geringen Erfolgen der Hetolvorbehandlung gegen die intravenöse Infektion der Milzbrandkeime waren die Aussichten bei der subkutanen Impfung von vornherein nicht grofs. Trotzdem wurden auch einige derartige Versuche angestellt. Sie führten, wie aus dem im folgenden wiedergegebenen Versuchsprotokollen hervorgeht, zu ganz ähnlichen Resultaten wie sub I.

Über die angewandte Technik ist wenig vorauszuschicken. Die Hetolinjektion wurde nach denselben Regeln vorgenommen wie bei den früher angeführten Versuchen. Auch der Zeitabstand zwischen der Hetolabgabe und der Infektion war der gleiche. In einigen Fällen wurde am zweiten Versuchstage die Hetolinjektion wiederholt, da bei subkutaner Infektion beide Ohren zur Hetolinjektion frei waren. Die Infektion wurde stets in das subkutane Gewebe am Bauch vorgenommen und geschah stets unter aseptischen Kautelen.

Es wurden im ganzen sieben derartige Versuche angestellt, von denen zwei nicht mit aufgenommen wurden, da in beiden Fällen eine Reaktion der Kontrolltiere ausblieb. Es handelte

sich in diesen Fällen um einen Wurf deutscher Kaninchen, die gegen Milzbrand in den angewendeten Dosen nahezu immun zu sein schienen.

Protokolle.

A. Tödlich verlaufene Fälle.

(Die Versuche sind nach der Höhe der Dosen geordnet.)

10. Kaninchen 46. — Gewicht 1400 g.

25. X. 3 15 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
6 Uhr: Infektion mit 180 Keimen unter die Bauchhaut.
26. X.: Gewicht 1320 g. Kein Ödem.
6 Uhr abends zweite Hetolinjektion.
27. X.: Gewicht 1220 g. Geringes Ödem an der Injektionsstelle, 12 Uhr mittags exitus.

Sektion: Geringes subkutanes Ödem an der Infektionsstelle, Milz vergröfsert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

11. Kaninchen 52. — Gewicht 1900 g.

6. XI. 10 Uhr vorm.: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
12 Uhr mittags: Infektion mit 250 Milzbrandkeimen unter die Bauchhaut.
7. XI.: Gewicht 1720 g. Kein Ödem.
8. XI.: Starkes Ödem an der Infektionsstelle.
10 30 Uhr vormittags exitus.

Sektion: Starkes, subkutanes Ödem an der Infektionsstelle, Milz vergröfsert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

12. Kaninchen 51. — Gewicht 2550 g.

6. XI. 10 Uhr vorm.: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
12 Uhr mittags: Infektion mit 375 Keimen unter die Bauchhaut.
7. XI.: Gewicht 2370 g. Geringes Ödem.
8. XI.: Gewicht 2350 g. Geringes Ödem.
9. XI.: Gewicht 2400 g. Starke Vergröfserung des Ödems.
10. XI.: Exitus.

Sektion: Das subkutane Ödem erstreckt sich über den ganzen Bauch bis in die Inguinalgegend. Milz vergröfsert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

B. Günstig verlaufene Fälle.

13. Kaninchen. 53. — Gewicht 1810 g.

6. XI. 10 Uhr vorm.: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

12 Uhr mittags: Infektion mit 125 Keimen unter die Bauchhaut.

7. XI.: Gewicht 1650 g. Kein Ödem.

8. XI.: Gewicht 1650 g. Kein Ödem.

9. XI.: Gewicht 1650 g. Kein Ödem.

10. IX.: Gewicht 1740 g. Kein Ödem.

Das Kaninchen bleibt am Leben und zeigt in der Folge keine Krankheitserscheinungen.

14. Kaninchen 45. — Gewicht 1600 g.

25. X. 3 30 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

6 Uhr: Infektion mit 360 Keimen unter die Bauchhaut.

26. X.: Gewicht 1650 g. Kein Ödem.

› 6 Uhr zweite Hetolinjektion.

27. X.: Gewicht 1620 g. Geringes Ödem am Bauch und an beiden Ohren. Bei den Hetolinjektionen war weden Enge der Venen etwas Hetol in das subkutane Gewebe der Ohren geraten

29. X.: Gewicht 1700 g. Die Ödeme bestehen noch.

30. X.: Gewicht 1720 g. Die Ödeme bestehen noch.

31. X.: Gewicht 1720 g. Die Ödeme sind vollständig resorbiert.

3. XI.: Gewicht 1770 g. Befinden gut.

17. XI.: Gewicht 1000 g. Das Tier zeigt keinerlei Krankheitserscheinungen.

Es sei auch hier wieder eine kleine Übersichtstabelle beigefügt:

Tabelle II.

Nr. des Versuchs	Zahl der eingebrachten Keime	Ödeme	Gewichtsveränderung in g	Tod an Milzbrand nach	Bemerkungen
13.	125	—	— 70	—	—
10.	180	+	— 180	2 Tagen	—
11.	250	+	— 180	2 ›	—
14.	360	vorübergehend	+ 300	—	wahrscheinlich refraktär
12.	375	+	— 150	4 Tagen	—

Nach diesen Ergebnissen am lebenden Tiere war nicht zu erwarten, dafs die anthrakozide Kraft des Blutplasmas in vitro

gegen die Norm gesteigert sei. Es wurde aber, als Probe aufs Exempel ein diesbezüglicher Versuch angestellt, der sich, wie folgt, gestaltete:

Einem Kaninchen wurde die übliche Hetoldosis verabreicht, auf der Höhe der Wirkung Blut aus der Karotis entnommen und auf Plasma verarbeitet. Dabei wurde nach den Angaben von R. Schneider verfahren, und das Blut zu 4‰ mit dem gerinnungshemmenden Natriumzitrat versetzt. Nach sorgfältiger Ausschleuderung aller korpuskulären Elemente wurde 1,0 ccm des völlig klaren Plasmas mit 3000 Milzbrandkeimen beschickt, so dafs also in 0,1 ccm der Aufschwemmung ursprünglich etwa 300 Keime enthalten waren. Dann wurde das Gemisch bei 38° angesetzt und durch das Plattenverfahren sofort, nach 1, 3 und 7 Stunden die Keimzahl ermittelt.

Es ergaben sich folgende Zahlen:

Aussaat von 0,1 ccm der Aufschwemmung:

sofort	320	Keime
nach 1 Stunde	274	»
» 3 Stunden	240	»
» 7 »	> 380	»

(Das Zeichen > erklärt sich daraus, dafs sich nach 7 Stunden eine aus Fibrin und Milzbrandfäden bestehende Flocke gebildet hatte und die Aufschwemmung daher keine gleichmäfsige mehr war.)

Es geht nicht wohl an, die unbedeutende Abnahme der obigen Zahlen auf die Wirkung einer bakteriziden Kraft zurückzuführen, und es dürfte somit auch in vitro der Beweis erbracht sein, dafs während der durch Hetol hervorgerufenen Hyperleukozytose keine anthrakoziden Substanzen in das Plasma abgegeben werden.

In ihren S. 6 zitierten Untersuchungen beobachteten Richter und Spiro nicht nur die Wirkung des Hetols auf die farblosen Blutelemente, sie stellten auch fest, dafs während des Ansteigens der Leukozytenzahl die Blutplättchen im arteriellen wie venösen Blut, in einigen Fällen bis zum völligen Verschwinden, abnahmen und nach Ablauf der Hyperleukozytose wieder in

normaler Zahl auftraten. Diese Angabe erweckte lebhaftes Interesse bei mir, da während meiner Arbeit Gruber und Futaki[1]) den Nachweis erbracht hatten, dafs die die Milzbrandbazillen tötende Substanz im Blutserum aus den Blutplättchen stamme und die unerwartete Einflufslosigkeit der Hyperleukozytose auf den Verlauf der Milzbrandinfektion vielleicht in dem gleichzeitigen Mangel der Blutplättchen im Blute seine Erklärung finden könnte. Nach den Versuchen von Gruber und Futaki sind die in den Kaninchenleukozyten enthaltenen anthrakoziden Stoffe wohl kaum von Bedeutung für die bakterizide Wirkung des Blutes, da sie in das Blutplasma anscheinend niemals abgegeben werden. Die milzbrandfeindliche Substanz des Kaninchenserums stammt anscheinend ausschliefslich aus den Blutplättchen und Gruber und Futaki machten es schon zur Zeit des Abschlusses dieser Untersuchungen zur Wahrscheinlichkeit, dafs diese Stoffe auf den Reiz der Milzbrandinfektion bereits im Tierkörper in das Blutplasma abgegeben werden.

Bei der Herstellung des Hetolplasmas hatte ich Gelegenheit, auf das Verhalten der Blutplättchen zu achten. Wären sie stark vermindert worden oder gar verschwunden, so hätte das von roten und farblosen Blutzellen befreite Plasma höchstens eine schwache oder gar keine Trübung mehr aufweisen dürfen. Es ergab sich jedoch eine ausgesprochene, dichte Trübung nach dem ersten Zentrifugieren, und am Schlufs der zweiten Ausschleuderung fand sich am Boden des Gläschens eine beträchtliche Menge von Blutplättchen, die der bei normalen Plasmen erzielten auf keinen Fall nachstand. Der Befund Richters und Spiros ist also gewifs kein gesetzmäfsiger.

Es ergibt sich, kurz wiederholt und zusammengefafst, aus der vorliegenden Arbeit:

1. dafs eine Steigerung der Resistenz des Kaninchens gegen Milzbrandinfektion durch die künstliche Vermehrung der

---

1) Münchener med. Wochenschrift, 1907, Nr. 6.

Leukozyten, wenn überhaupt, nur in ganz geringem Maſse möglich ist;

2. daſs das Kaninchenblutplasma auch auf der Höhe der Hetolhyperleukozytose keine bakterizide Kraft besitzt;
3. daſs die Zahl der Blutplättchen auf der Höhe der Hetolhyperleukozytose jedenfalls nicht immer vermindert ist.

Zum Schluſs sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Obermedizinalrat Professor Dr. Max Gruber, für die wertvolle Anregung und das stets entgegengebrachte Wohlwollen bei der Arbeit meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

Bail, Archiv für Hygiene, Bd. 30.
Blumreich und Jacobi, Berliner klin. Wochenschr., 1897.
Buchner, Berliner klin. Wochenschrift, 1890, Nr. 47.
—, Münchener med. Wochenschrift, 1894.
—, Archiv für Hygiene, Bd. X u. XVII.
Charteris und Provan Cathart, Journ. Pathol. u. Bakteriol. 10 (zitiert nach Malys Jahresber. 1904/1905).
Crispino, Giorn. intern. Scienza med., Nr. 21 (zitiert nach Baumgartens Jahresber. 1899).
Ehrlich und Lazarus, »Die Anämie«. Spez. Path. u. Therap. Notnagel, Bd. VIII, I. Teil, 1901.
Goldscheider und Jacob, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 25.
Grammatschikoff, Annales de l'institut Pasteur, 1893.
Gruber, Verhandlungen des 14. Kongresses für innere Medizin. Wiesbaden 1896, S. 227.
—, Münchener med. Wochenschrift, 1901.
Gruber und Durham, Wiener klin. Wochenschrift, 1903, S. 1097.
Gruber und Futaki, Zentralblatt f. Bakt., Bd. 38, 1906, Beiheft.
— —, Münchener med. Wochenschrift, 1907, Nr. 6.
Hahn, Kolle-Wassermann IV, 1904.
—, Archiv f. Hygiene, Bd. 25, 26 und 28.
Hankin, Zentralblatt f. Bakteriol., Bd. 12 u. 14.
Havet, La cellule t. X., 1893.
Jacob, Zeitschrift f. klin. Medizin, Bd. 30.
Landerer, Münchener med. Wochenschrift, 1888 und 1889.
—, Deutsche med. Wochenschrift, 1890 und 1893.
—, »Die Behandlung der Tuberkulose mit Zimtsäure«, 1892. F. C. W. Vogel. Leipzig.

Landerer, Vortrag auf dem Tuberkulosekongreſs zu Berlin, 1899.
—, ›Berliner Klinik‹, 1901.
van Leent, Zentralblatt f. Bakteriol., Bd. 28, 1900.
Loewit, Zieglers Beiträge, Bd. 22.
—, ›Physiologie und Pathologie des Blutes etc.‹ 1892. Fischer, Jena.
Loewy und Richter, Deutsche med. Wochenschr., 1895, Nr. 15.
— —, Virchows Archiv, Bd. 151.
Noetzel, Archiv f. klin. Chirurgie, 1897, 1898 und 1900.
Pawlowsky, Zentralbl. f. Bakteriol., 1894. Mitteilungen auf dem XI. internationalen Kongreſs.
Pfeiffer und Marx, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, Bd. 27.
Richter P., Virchows Archiv, Bd. 133, 1893.
Richter und Spiro, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 34.
Schattenfroh, Münchener med. Wochenschrift, 1897.
—, Archiv f. Hygiene, Bd. 31.
Schneider R., Münchener med. Wochenschrift, 1907, Nr. 3.
Schuster K., Inaugural-Dissertation, München 1894.
Spiro, Inaugural-Dissertation, Leipzig 1893.
Vaughan, Bericht vom Kongreſs in Budapest (Zentralbl. f. Bakt., Bd. 16).
Werigo, Annales de l'institut Pasteur, 1891.
Wooldridge, Archiv f. Anatom. u. Physiolog., physiolog. Abteil., Bd. 3.

Über die Ursache der Hauterkrankung bei Anwendung von Dauerbädern.

Von

Privatdozent Dr. **Küster,**
I. Assistenten am Institute.

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Freiburg i. Br.
Direktor Geh. Hofrat Prof. Dr. Schottelius.)

(Mit Tafel II, III und IV.)

Seitdem die Dauerbadbehandlung in der Therapie modern eingerichteter psychiatrischer Kliniken einen hervorragenden Platz eingenommen, hat man bei dieser Behandlung unterzogenen Patienten häufig eine eigentümliche Hauterkrankung auftreten sehen, die bis dahin niemals beobachtet war und geradezu als eine Folge des Dauerbades bezeichnet wurde. Das Badeekzem[1]) tritt vorzüglich bei kachektischen Personen, mit Vorliebe bei Paralytikern auf, doch bleiben auch andere Patienten durchaus nicht immer verschont; da bei Frauen die Paralyse selten auftritt, so kommt auf männliche Patienten ein weit höherer Prozentsatz von Badeekzemen. Die Erkrankung pflegt meist aufzutreten, wenn die Patienten etwa 14 Tage im Dauerbad liegen, daneben werden auch Früh- (3—4 Tage) und Spätformen (4 Wochen und mehr) des Auftretens beobachtet; zunächst zeigt sich meist an der Innenfläche der Oberschenkel, an den Genitalien oder wo die Skrotalhaut dem Schenkel anliegt, dann in der Leistenbeuge,

1) Vgl. Jakobi, Eine besondere Form der Trichophytie als Folgeerscheinung des permanenten Bades. Arch. f. Dermat. u. Syph., 84. 3.

aufserdem aber frühzeitig auch in der Umgebung der Achselhöhle und am Oberarm eine diffuse dunkle Rötung.

Nimmt man die Patienten aus dem Bade, so erkennt man (nachdem die Haut etwas abgetrocknet ist) bei genauem Zusehen, dafs die Rötung durch massenhaftes Auftreten von kleinsten, roten Papeln hervorgerufen wird. Die anfangs disseminiert stehenden Papeln nehmen rasch nach der Fläche zu, werden flach beetartig und konfluieren; die erkrankten Hautpartien sehen jetzt mehr blafs aus, die intensive Rötung verschwindet, weil sich auf der Oberfläche ein schmieriger Belag von aufgeweichten, abgestofsenen Epithelien ansammelt. Bleiben die Patienten dauernd im Bade, so schreitet die Erkrankung unaufhaltsam fort und schliefslich sind alle vom Wasser bedeckten Körperoberflächen erkrankt; Haare und Nägel bleiben gesund. Meist ist dann auch der dekrepide Zustand (vielleicht durch die schweren Hautveränderungen gefördert) soweit vorgeschritten, dafs der Exitus letalis eintritt.

Gestattet es der Allgemeinzustand des Patienten, diesen bei Beginn der oben besprochenen gut charakterisierten Hautveränderungen (die ausführliche Beschreibung siehe bei Jakobi a. a. O.) aus dem Bade zu nehmen, so heilt die Veränderung meist in kurzer Zeit glatt ab: die geröteten erkrankten Hautpartien blassen ab, die Haut schält sich und unter den Schälschuppen erscheint wieder gesunde Haut. Die Abheilung der Anfangsstadien der Hauterkrankung bei Unterbrechung der Badebehandlung erfolgt ohne therapeutisches Zutun in wenigen Tagen, während im Bade selbst bis jetzt jede therapeutische Mafsnahme vergeblich gewesen ist.

Ist die Erkrankung im Bade schon weiter vorgeschritten, sind schon gröfsere Hautpartien verändert, so läfst sich durch Entfernung aus dem Bade der Erkrankung kein Einhalt mehr gebieten, denn jetzt verursacht das Abtrocknen der grofsen Hautherde starke Spannungen; es entstehen trotz therapeutischer Gegenmafsregeln (Einfetten etc.) blutende Schrunden und Risse, und die Patienten werden durch starke Schmerzen so gequält, dafs man sich genötigt sieht, dieselben wieder ins Dauerbad zu

legen; die Hauterkrankung beginnt natürlich dadurch von neuem. Hierzu kommt noch, dafs viele der Patienten ursprünglich wegen Dekubitus in das Dauerbad gegeben werden, hier heilt nun der Dekubitus sehr gut ab, aber wenn solche Patienten nun an Badeekzem erkranken und jetzt der Versuch gemacht wird, dieses durch Bettbehandlung zur Abheilung zu bringen, so tritt meist der Dekubitus mit besonderer Heftigkeit wieder auf.

Bei diesem Circulus vitiosus ist es kein Wunder, dafs das Badeekzem von Psychiatern geradezu als eine Crux medicinae empfunden wird, und es verlohnte sich daher wohl der Mühe, diese Krankheit eingehend zu studieren.

Durch das liebenswürdige Entgegenkommen des Vorstandes der hiesigen Psychiatrischen Universitätsklinik, Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. Hoche, der mir das Krankenmaterial seiner Klinik zur Verfügung stellte, war ich in der Lage, mich im Laufe des letzten Jahres eingehend mit der Erforschung des Badeekzems zu befassen. Da gleichzeitig der Vorstand der Universitäts-Hautklinik, Herr Prof. Dr. Jakobi, das Badeekzem vom Standpunkte des Dermatologen studierte, so erhielt ich bei meinen Untersuchungen eine Reihe von fördernden sachgemäfsen Anregungen, für die ich Herrn Prof. Jakobi auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausdrücke.

Meine Untersuchungen begannen damit, dafs ich mit sterilem Skalpell die schmierigen Epithellagen, die sich auf den erkrankten Hautpartien des Patienten vorfanden, abschabte und mikroskopisch untersuchte.

Im einfachen Quetschpräparat erkannte man zunächst massenhaft abgestofsene Hautzellen und Reste derselben von sehr verschiedenartiger Form, bald mit, bald ohne Kern; dazwischen wohlerhaltene polynukleäre Leukozyten. Die Betrachtung mit Ölimmersion machte grofse Massen von Mikroorganismen sichtbar, Bazillen- und Kokkenformen. Am auffallendsten aber war das Vorhandensein von Mycelfäden sowie runder bis ovaler Zellformen, welche deutlich Kerne enthielten. Setzte man dem Präparat Kalilauge zu, so traten die beiden letztgenannten Gebilde besonders deutlich hervor, während Spaltpilze und Körperzellen sich

aufhellten. Auf Fig. 1 ist ein solches Präparat bei 600facher Vergröfserung abgebildet. Man sieht hier Mycelfäden von etwa 4 μ Dicke, welche sich oft durch das ganze Gesichtsfeld hinziehen, dieselben sind in verschieden grofsen Abständen von deutlichen Querwänden durchzogen und zeigen in ihrem Innern hellglänzende Pünktchen sowie Vakuolen und kernartige Bildungen. Die Querwände rücken nach der Spitze des Fadens meist enger zusammen, und vielfach endet der Faden mit einer hefenzellenartigen Anschwellung; neben diesen Mycelfäden, an denen man zuweilen im frischen Präparate auch seitliche Abschnürungen findet, sieht man im Bilde auch Häufchen von Zellen, die kernhaltig, bald rund, bald in die Länge gestreckt erscheinen und grofse Ähnlichkeit mit Hefezellen haben. Ein Zusammenhang der Fäden und Zellhäufchen liefs sich in frischen Präparaten nicht konstatieren und erschien auch zunächst unwahrscheinlich.

Aus Analogieschlüssen mit ähnlichen Hauterkrankungen, den Trichophytien (Makrosporien) mufste man annehmen, dafs in den Mycelfäden der Erreger des Badeekzems zu erblicken sei, und es galt daher, diese Fäden in Kultur zu gewinnen.

Abgeschabtes Hautmaterial, das mikroskopisch viele Fäden zeigte, wurde in sterilem Porzellanmörser, teils direkt, teils unter Zusatz von steriler Kieselgur verschieden fein zerrieben und davon eine grofse Anzahl von Platten gegossen. Mit Rücksicht auf die zahlreichen Begleitbakterien wurden starke Verdünnungen angelegt. Als Nährbodenmaterial wurde Gelatine, Glyzerin-Agar, glyzerinfreier Pepton-Agar, Aszites-Agar, erstarrtes Glyzerin-Pferdeblutserum und Maltose-Agar nach Sabernaud (Milieu d'épreuve) verwandt. Die besäten Platten wurden teils bei Zimmertemperatur (18—25° C), teils bei 37° im Brutschrank gehalten, aufserdem einige Platten in sauerstofffreie Atmosphäre gebracht. Auf fast allen Kulturen wuchsen reichlich Kolonien, Spaltpilze von verschiedenen Formen, daneben auch weifse und schwarzbraun wachsende Hefen: das Bild der Wasserflora eines stark verunreinigten Wassers, aber nirgends fand ich eine Kolonie, die in ihrem mikroskopischen Bilde Mycelfäden erkennen liefs.

Die Versuche wurden mit Material von verschiedenen Patienten wiederholt: dasselbe Bild. Da auf Milieu d'épreuve besonders mannigfache Kolonien wuchsen, wurde von diesem Nährboden eine Serie in der Weise angelegt, dafs von Platte zu Platte die Reaktion von stark sauer bis zu stark alkalisch abgestuft wurde; ich dachte, auf diese Weise vielleicht eine Reaktion zu finden, bei welcher der Mycelbildner besonders gut wüchse, während die anderen Keime gehemmt würden; der Erfolg blieb aus.

Jetzt versuchte ich, durch Tierversuche den Keim zu übertragen, um ihn vielleicht hier rein zu gewinnen. Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse wurden mit frischem Material auf die rasierte, unverletzte oder vorher skarifizierte Haut energisch eingerieben: alle blieben gesund, Einimpfung mit der Spritze wurde je nach der Menge des eingebrachten Materials bald symptomlos vertragen, bald kam es zur Abszedierung, oder das Tier ging an Sepsis zugrunde, niemals erhielt ich spezifische Veränderungen.

Da in den Dauerbädern der Erreger offenbar deswegen haftete, weil hier an der aufgeweichten und macerierten Haut der dekrepiden Individuen ganz besondere Wachstumsbedingungen gegeben waren, so suchte ich diese Verhältnisse im Tierversuch in folgender Weise nachzuahmen: weifse Mäuse wurden in weite Gläser gesetzt, deren Boden etwa $1^1/_2$ cm hoch mit Wasser bedeckt war. In diesem Wasser wurde reichlich abgeschabtes Hautmaterial aufgeschwemmt, das Futter (Milchbrot) wurde auf kleinen, schwimmenden Holzklötzchen gereicht, die ganzen Gläser bei Bruttemperatur gehalten: die Tiere nahmen schlecht Futter auf und gingen in 3—4 Tagen stark abgemagert zugrunde, ohne dafs eine Hautveränderung zu finden war.

Ich befestigte dann Ratten durch Drahtnetze auf Holzbrettchen, zog ihren Schwanz durch ein Loch des Brettchens nach unten durch und liefs das ganze Brett auf infiziertem Wasser schwimmen. Diese Tiere blieben am Leben, aber vergeblich untersuchte ich den eingetauchten Schwanz auf haftende Mycelfäden.

Nachdem ich dann noch einige Methoden, welche die Botaniker zur Reinzüchtung von Mycelien zu verwenden pflegen, ohne Erfolg versuchte, glaubte ich schon alle Mühe vergebens und neigte zu der Ansicht, daſs wir es hier mit einem jener Erreger von Hautkrankheiten zu tun hätten, die wir mit unseren gegenwärtigen Hilfsmitteln nicht züchten können.

Nur schwer lieſs ich mich von Herrn Prof. Jakobi dazu bewegen, nochmals die Züchtung zu versuchen. Von der Ansicht ausgehend, daſs nur eine möglichst weitgehende Anpassung an die natürlichen Verhältnisse hier zum Ziele führen könnte, legte ich nunmehr alle Kulturen bei Badetemperatur (37°) und dazu unter Wasser an. Dabei erwiesen sich die Begleitbakterien als sehr störend, denn dieselben vermehrten sich in dem über den Nährböden aufgeschichteten sterilen Wasser, welches natürlich aus den Nährmedien reichlich Nahrungsstoffe löste, derartig, daſs in kurzer Zeit die ganzen Kulturen in starker Fäulnis waren. Dieser Umstand veranlaſste mich, Desinfizientien in steigenden Dosen den Kulturgefäſsen zuzusetzen, vielleicht, daſs die Spaltpilze von einem derselben stärker beeinfluſst würden als die Mycelien und dadurch eine Reinzucht gelänge. Diese Erwartung erfüllte sich. Durch tropfenweises Zusetzen verdünnter Formalinlösung zu Nährmedien, welche aus fest erstarrtem Glyzerin-Pferdeblutserum mit aufgeschichtetem, sterilem Wasser bestanden, gelang es, eine Kombination zu finden, bei der nur noch die Mycelien überlebten und sich, wenn auch erst langsam, im Verlauf von 2—3 Wochen vermehrten. Es bildeten sich im Wasser weiſsgraue Flocken, die an Gröſse deutlich zunahmen, während jede Bakterienvermehrung ausblieb. Die mikroskopische Untersuchung zeigte reichlich Mycelfäden und daneben hefeähnliche Zellen, die morphologisch den im Quetschpräparat gesehenen Gebilden vollständig identisch waren. (Fig. 2.) Das Kulturverfahren wurde an drei verschiedenen Fällen von Badeekzem wiederholt und eine Reihe von Kontrollen angelegt; ich hatte stets das gleiche Resultat.

Zunächst glaubte ich eine Mischkultur zweier Mikroorganismen vor mir zu haben, von denen die eine ein Mycelbildner wäre,

während die andere zu den Hefearten zu rechnen wäre. Kulturen auf festen Nährmedien ergaben jedoch eine andere Erklärung.

Ich legte nach der von Hansen zur Reinzüchtung von Hefen angegebenen Methode Einzellenkulturen an, indem ich Kulturmaterial aus den Formalinwasserkolben in viel flüssiger Gelatine aufschwemmte und diese Verdünnung auf quadrierten, grofsen Deckgläsern (6 : 6 cm) mit dem Platinpinsel dünn ausstrich. Man erhielt so in dem erstarrten Nährmaterial fixierte einzelliegende Keime, deren Lage an der Deckglaseinteilung leicht notiert werden und deren Wachstum unter dem Mikroskop von Tag zu Tag gut verfolgt werden konnte. Die Deckgläser wurden mit der Materialseite nach unten auf Glasringe aufgelegt und in feuchten Kammern bei 25° aufbewahrt.

Man konnte nun direkt beobachten, wie beide Wuchsformen: Mycelfäden und hefeartige Zellen ineinander übergingen. Beobachtete man eine einzelliegende hefeartige Zelle, so sah man zunächst, dafs die Zelle in die Länge wuchs und sich dann durch eine in der Mitte gebildete Querwand in zwei Individuen abschnürte: also keine Knospung-, bzw. Tochterzellenbildung wie bei den echten Hefen, sondern Teilung, wie wir sie bei den höheren Pilzen (Askomyceten) zu sehen gewohnt sind. Durch fortgesetzte Teilung der neugebildeten Zellen entstanden grofse Kolonien, die bei 60facher Vergröfserung mit ihrem granulierten Aussehen durchaus an Hefekulturen erinnerten.

Bei starker Vergröfserung und besonders dann, wenn man die sicher aus einer Zelle hervorgegangene Kolonie mit physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmte und im hängenden Tropfen betrachtete, sah man jedoch, dafs einzelne Individuen einen abweichenden Wachstumstypus zeigten. Bei diesen war nämlich bei starkem Längenwachstum die Querteilung unterblieben, so dafs kleine Schläuche entstanden. Da an diesen kurzen Fäden das eine Ende meist deutlich verdickt war und noch gut die Form der Ausgangszelle erkennen liefs, so schlofs ich hieraus, dafs nach einer Seite ein Wachstum der Mutterzelle erfolgt war, zumal häufig der Faden nach dem freien Ende zu sichtbar an Kaliber abnahm. Wir hatten es hier also sicher

mit beginnender echter Mycelfadenbildung zu tun. Diese Erscheinung wurde noch deutlicher, wenn man die Reinkulturen auf glyzerinfreien Peptonagar übertrug. Hier bildeten sich zunächst runde, weiſse, leicht abstreichbare, granulierte Kolonien; von diesen wuchsen nach 4—5 Tagen lange Mycelfäden hervor, wie dies Fig. 3 veranschaulicht. Die Fäden zeigen eine gut hervortretende Zellwand und im Inneren granuliertes Protoplasma mit einzelnen starklichtbrechenden Körnchen, Vakuolen und Kernen. Die Fäden sind durch Querwände septiert, welche nach der Wachstumsspitze zu enger zusammenliegen.

Sowohl von der Spitze des Fadens als auch von den Stellen, wo Querwände vorhanden sind, schnüren sich nun die obenerwähnten hefeartigen Gebilde ab, die sich rasch vermehren und so zur Bildung von neuen Wachstumszentren den Ausgangspunkt geben. Von diesen werden dann wieder Fäden vorgeschoben und der Wachstumszyklus beginnt von neuem.

Auf Grund der beobachteten oben beschriebenen Vermehrung des Pilzes haben wir in dem aus dem Badeekzem gezüchteten Mikroorganismus einen Vertreter der Askomyten zu erblicken: die von dem Mycel abgeschnürten hefeartigen Zellen sind typische Athrosporen oder Konidien. Eine genaue botanische Klassifizierung ist solange unmöglich, als es nicht gelingt, den Pilz zur Fruktifikation zu bringen.

Die ursprüngliche Annahme einer Hefeart wurde auch durch folgende Untersuchung als irrig erwiesen.

Der Pilz zeigte kein für Heferassen charakteristisches Wachstumsoptimum, und bildete auf keiner Nährsubstanz, auch nicht auf Gipsblockkulturen echte Endosporen. Den verschiedenen Zuckerarten gegenüber hatte er ein indifferentes Verhalten. In schwach alkalischen Neutralrotgärröhrchen, denen Traubenzucker, Milchzucker, Lävulose, Maltose, Inulin, Rohrzucker oder Mannit zugesetzt war, fand zwar Wachstum des Keimes statt, es wurde aber weder Gas gebildet, noch auch das Neutralrot verändert.

Der Erreger ist in Reinkultur auf alle gebräuchlichen Nährböden überimpfbar, allerdings stöſst die Übertragung aus der Formalinwasserkultur auf feste Nährböden anfangs häufig auf

Schwierigkeiten, und die Kultur gelingt erst bei wiederholtem Versuch.

Das charakteristische Wachstum auf einigen Nährböden ist aus Fig. 4 ersichtlich.

Quadrant *a* ist eine Kultur auf glyzerinfreiem Agar. Hier ist nach etwa 10 Tagen schon mit unbewaffnetem Auge das Auswachsen der Myzelfäden aus den Kolonien wohl zu erkennen. Das Zentrum der Kolonie erscheint gelbweifs mit fein granulierter Oberfläche.

Quadrant *b* zeigt eine gleichalte Kultur des Erregers auf Glyzerin-Agar. Das Wachstum ist hier im allgemeinen weit üppiger, es kommt zu lebhafter Konidienbildung, während längere Mycelfäden nur ausnahmsweise gebildet werden, eine Erfahrung, die man auch bei üppigem Wachstum anderer Askomyzeten zu machen pflegt. Die Oberfläche der Kolonie hat ein eigenartiges, ringwallartiges Aussehen und nimmt einen bräunlichen Farbenton an.

In Quadrant *c* ist eine 4 Wochen alte Bierwürzgelatinekultur abgebildet. Hier sind reichlich Mycelfäden gebildet; diese wachsen zum Teil frei über die Oberfläche hervor und diese nimmt dadurch ein schönes, samtartiges, gestreiftes Aussehen an.

Der letzte Quadrant gibt das Bild einer 14 tägigen Kartoffelkultur wieder. Das Wachstum erinnert sehr an das auf Bierwürzgelatine, ist aber dadurch besonders unterschieden, dafs das samtartige Aussehen viel später und nur in Randpartien auftritt. Die Abbildung ist deshalb gewählt, weil in der Kartoffelkultur besonders merkwürdige Wuchsformen (Degenerationsformen?) auftreten, die weiter unten beschrieben und in Fig. 5 dargestellt sind.

Die Kulturen auf den übrigen Nährböden bieten wenig Charakteristisches. Bouillon zeigt einen dicken flockigen Bodensatz, die Reaktion wird in 6 Wochen nicht deutlich verändert. Milch wird nicht koaguliert. Zusatz von Bierwürze zu einem Nährboden unterstützt das Wachstum. Anaerob findet keine Vermehrung statt, doch bleibt der Erreger unter anaeroben Verhältnissen lange am Leben.

Der Erreger läſst sich im Reinkulturausstrich zwar mit allen Anilinfarben darstellen, der feinere Bau tritt jedoch bei den einzelnen Färbmethoden sehr verschieden zum Vorschein.

Nach Gram färben sich alle Wuchsformen homogen, die schönsten und instruktivsten Bilder erhält man bei der Färbung nach Giemsa, Romanowski, Leishmann sowie nach der Neisserschen Körnchenfärbung für Diphtheriebazillen.

Bei diesen Methoden wird folgendes sichtbar: Die Konidien bestehen aus einer deutlich differenzierten äuſseren Membran, die ein granuliertes Protoplasma einschlieſst, dessen Granula sich braunrot bis eosinrot färben. Im Protoplasma sieht man einen bis mehrere Kerne. Bei den Mycelfäden ist nur die äuſsere Hülle gut gefärbt, während das Protoplasma verschieden groſse Hohlräume aufweist. Es macht den Eindruck, als ob in den älteren Partien der Fäden das Protoplasma in der Mitte verschwindet und nur in einer schmalen, der Zellwand anliegenden Schicht bestehen bleibt; auch die in den Fäden vorhandenen Kerngebilde rücken in die Randpartien des Mycels.

Der Erreger zeigt schon auf den üblichen Agar-Nährböden in wenigen Tagen einen ausgedehnten Pleomorphismus, aber am deutlichsten tritt dieser hervor, wenn man einen Ausstrich von einer etwa 10 Tage bei 37° gewachsenen Glyzerinkartoffelkultur nach Leishmann untersucht. Fig. 5: Hier sind die Mycelfäden, auch bei vorsichtiger Präparation, meist nur in kurzen Fragmenten vorhanden. Die Konidien zeigen ganz verschiedene Gröſse und Form, während die kleineren der frisch abgeschnürten Athrosporen der Agarkulturen analog sich verhalten, haben die gröſseren Formen ihre scharfe Zellmembran verloren, der Kern ist vielfach mehrlappig geworden, so daſs ihr ganzes Aussehen unwillkürlich an farblose Blutzellen der Warmblüter erinnert. Gerade dieses Verhalten älterer Konidienformen macht das Erkennen derselben im Gewebsschnitt auſserordentlich schwierig und häufig unmöglich.

Der beschriebene Askomycet ist der Erreger der Trichophytien kachektischer Individuen in Dauerbädern, denn er wurde bis jetzt in allen untersuchten Fällen aus den erkrankten Haut-

partien in Reinkultur gezüchtet; er findet sich in der kranken Epidermis regelmäſsig in solchen Mengen, daſs die Schwere des Krankheitsbildes hinreichend erklärt ist. Die Forderung, daſs der Keim, welcher für eine bestimmte Krankheitsform verantwortlich gemacht wird, sich sonst nicht als Saprophyt vorfinden soll, darf bei einem Askomyzeten, der sich nur unter ganz besonderen Umständen (kachektisches Individuum mit durch Dauerbad macerierter Haut) ansiedelt, nicht gestellt werden. Ich glaube, den Erreger, und zwar die Konidienform desselben in Formalinkultur aus frischem Badewasser gesehen zu haben, ätiologisch wäre dieses Vorkommen ja auch sehr wahrscheinlich, aber eine Anreicherung gelang nicht, so daſs ich mir in dieser Beziehung noch kein endgültiges Urteil erlauben darf. Eine Überimpfung frischen Materials auf kräftige Individuen in und auſserhalb des Dauerbades verlief (nach Jakobi), wie übrigens aus oben Gesagtem von Anfang an zu erwarten war, resultatlos.

Ein wichtiges Glied in der Beweiskette für die pathogene Bedeutung des gefundenen Mikroorganismus bildet der Befund im Gewebsschnitt. In den oberflächlichsten Schichten der Epidermis findet man natürlich alle die Keime, welche auf den verschiedenen festen Nährböden zum Wachstum gelangten und das Angehen des Askomyzeten wahrscheinlich verhinderten; in den tieferen Schichten der Erkrankungsherde, in den stärkst veränderten Hautpartien findet man jedoch lediglich den Askomyzeten. Derselbe kommt hier, Fig. 6, in seinen beiden charakteristischen Formen: Mycelfäden und Athrosporen vor. Die Darstellung im gefärbten Schnitt ist auſserordentlich schwierig und gelingt bei Anwendung derselben Methode bei dem einen Schnitt, während sie bei vielen anderen miſslingt. Diese Schwierigkeit wird dadurch bedingt, daſs der Erreger im Schnitt nur verhältnismäſsig schwer Farbe annimmt, man muſs deshalb stark überfärben und durch nachheriges Differenzieren den Zeitpunkt abpassen, bei dem die Hautzellen ihre Farbe schon möglichst abgegeben haben, während der Pilz noch gefärbt bleibt. Da nun das Festhalten der Farbe in dem Erreger nur wenig gröſser ist als das in den Körperzellen, so ist man bei der Gewinnung guter

Präparate sehr vom Zufall abhängig. Dazu kommt noch, daſs die Konidienform des Erregers, wie schon bei Fig. 2 erwähnt, häufig wie eine Körperzelle aussieht, so daſs man bei Beurteilung des histologischen Bildes sehr vorsichtig sein muſs.

Ich möchte die ausführliche Besprechung der pathologisch-histologischen Veränderungen erst in dem zweiten Teil meiner Abhandlung vornehmen und hier nur einen allgemeinen Überblick über dieselben geben.

Man sieht in den obersten Hautschichten, dem Stratum corneum kleine Erkrankungsherde, in denen sich verschiedenartige Zellformen sowie deutliche Mycelfäden vorfinden. An vereinzelten Stellen sieht man, wie die Mycelien in den Haarbälgen oder Drüsengängen liegen, ohne daſs es hier jedoch zu stärkeren Zellreaktionen käme. Die tieferen Hautpartien erscheinen bis auf eine Erweiterung der Hautkapillaren im wesentlichen normal, Plasmazellen dürften etwas vermehrt vorkommen, auch sieht man an verschiedenen Stellen Leukozyten, die auf der Wanderung von den Kapillaren zu den Krankheitsherden begriffen sind. An einer Stelle gewahrte ich auch einen breiten Durchbruch von Wanderzellen von einem Blutgefäſs durch das Stratum malpighii zu dem darüberliegenden Infektionsherd.

In Fig. 6 ist eine der meist vorgefundenen Erkrankungsherde mit Mycelfäden dargestellt. Konidienformen des Erregers und Körperzellen lassen sich bei der angewandten Färbung[1]) hier mit Sicherheit nicht unterscheiden, ich werde später noch ausführlich darauf zurückkommen. Daneben findet man in demselben Schnitt auch kleine Herde, in denen der Erreger nicht zu erkennen ist. Anderweitige Mikroorganismen kommen in den eigentlichen Erkrankungsherden nicht vor, finden sich aber reichlich in den obersten, in starker Abschuppung begriffenen Partien der Epidermis.

Die Identität des im Schnitte sichtbaren Erregers mit dem gezüchteten Askomyzeten ist nach meiner Ansicht zweifellos.

1) 5 Min. Anilinmethylviolett, differenzieren mit Anilinxylol, kurz Eosin Alkoh. absolut, Abtrocknen mit Flieſspapier, Xylol, Kanadabalsam.

Zwar war ich bis jetzt nicht imstande, Hautveränderung mit demselben zu erzeugen, aber bei der Einspritzung von Reinkultur in den tierischen Organismus entwickelt der Pilz echt pathogene Eigenschaften, die auch unter Umständen den Tod des Tieres bedingen. Ich experimentierte bis jetzt an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen; die Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen und werden in dem zweiten Teil ausführlich mitgeteilt werden.

Zurzeit werden auch Untersuchungen darüber angestellt, welche Desinfizientien besonders stark das Wachstum des Pilzes hemmen, vielleicht dafs es auf diese Weise gelingt, ein Heilmittel gegen das Badeekzem zu gewinnen, nachdem dasselbe, wie Jakobi mitteilt, bis jetzt allen therapeutischen Mafsnahmen getrotzt hat.

Wenn ich am Schlusse des bakteriologischen Teiles meine Untersuchung noch einmal kurz zusammenfasse, so hat sich folgendes ergeben:

1. Die bei Dauerbadebehandlung auftretende Trichophytie wird durch einen Pilz bedingt, welcher zur Gruppe der Askomyzeten gerechnet werden mufs.
2. Die Reinzüchtung des Pilzes gelingt in Formalinwasserkulturen.
3. Der Pilz hat pathogene Eigenschaften besonders für Kaninchen, aber auch für Meerschweinchen, Ratten, Mäuse und Frösche.

Freiburg, 17. April 1907.

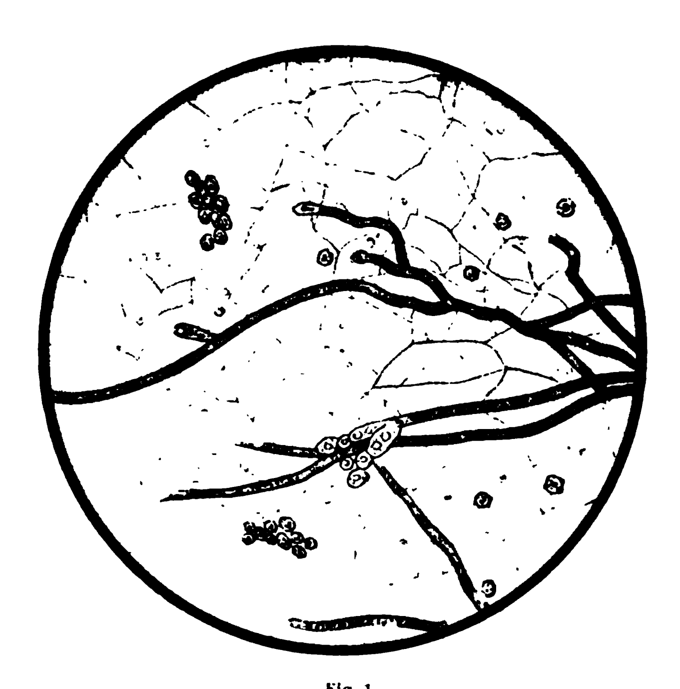


Fig. 1.
Frisches Quetschpräparat von abgeschabten Epidermisschuppen (mit verdünnter KOH).

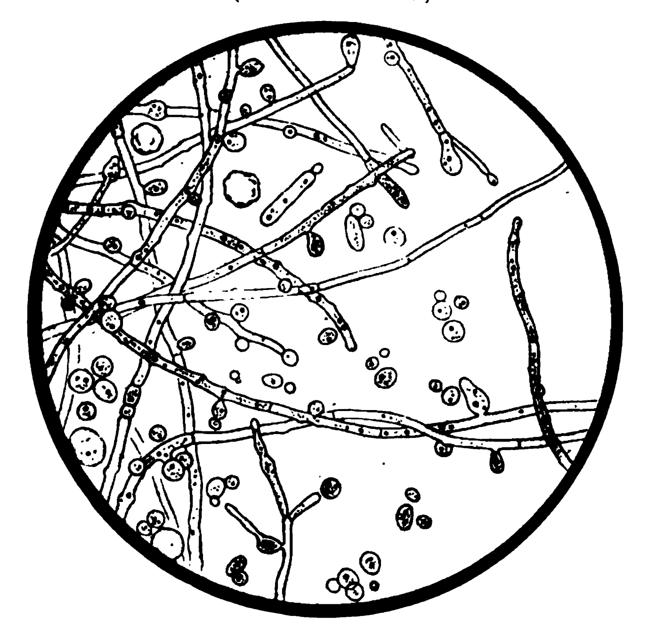


Fig. 2.
Kultur des Erregers unter Formalinwasser.

Verlag von R. Oldenbourg, München und Berlin.



Fig. 3.
Randpartie einer Kultur des Erregers auf glyzerinfreiem Agar.
(200 fach.)

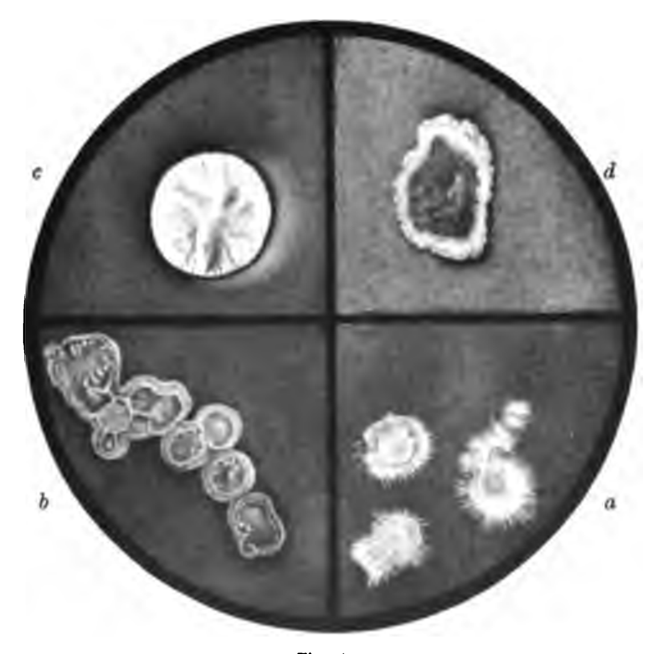


Fig. 4.
Reinkulturen auf verschiedenen Nährmedien.

Verlag von R. Oldenbourg, München und Berlin.



Fig. 5.
Ausstrich einer 14 tägigen Kartoffelkultur.
(600 fach.)



Fig. 6.
Schnitt durch einen Erkrankungsherd der Haut.
(600 fach.)

Verlag von R. Oldenbourg, München und Berlin.



